



## 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학박사학위논문

식물체 ADP-ribosylation factor 1  
유전자의 기능에 관한 연구

Functional Characterization of Plant  
ADP-ribosylation Factor 1 Gene

2017년 8월

서울대학교 대학원  
생명과학부  
김동균

## 초록

식물의 생장과 발달에 부정적인 영향을 주는 고온, 건조, 저온, 고염도와 같은 비생물 스트레스는 식물의 성장뿐만 아니라 작물의 품질과 생산성에도 큰 피해를 주게 된다. 비생물 스트레스에 의한 작물의 피해는 지구 온난화로 인한 기후변화에 의해 더 증가 될 것으로 보인다. 그렇기 때문에 비생물 스트레스에 내성을 갖는 작물을 개발하기 위하여 비생물 스트레스에서 식물체에서 일어나는 유전자 수준의 반응을 연구하는 것은 매우 중요하다. 고온스트레스를 처리한 고추(*Capsicum annuum*)의 cDNA library에서 고온 유도성 cDNA 클론인 *CaPP2C* (*Capsicum annuum* protein phosphatase 2C), *CaMAPK1* (*Capsicum annuum* mitogen-activated protein kinase 1), *CaBI-1* (*Capsicum annuum* Bax inhibitor-1)이 분리 되었고, 3개의 유전자의 전사물들은 고온스트레스 이외에 다양한 비생물 스트레스 조건에서 발현이 유도되었다. *CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1*을 CaMV 35S 프로모터의 제어 하에 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환으로 담배(*Nicotiana tabacum*)에 과다 발현 시켰다. RNA blot 분석을 통해 *CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1*이 각각의 형질전환체 담배에서 과다발현 되었음을 확인 하였으며 이들 형질전환체 담배의 생체분석을 수행하였다. 3개의 유전자를 각각 과다발현한 형질전환체는 대조군 식물체와 비교한 결과, 그들의 형태적 차이를 확인 할 수 없었고 비생물 스트레스에도 내성을 보이지 않았다. 3개의 유전자를 각각 과다발현한 형질전환 식물체의 전사체 분석에서, 공통적으로 ARF 유전자의 상향조절이 확인 되어, ARF 유전자가

비생물 스트레스에 기능을 가질 것이라 예상하여 담배에서 ARF 유전자를 분리하였다. 분리된 9개의 담배 ARF cDNA 클론중 *NtARF1* (*Nicotiana tabacum* ADP-ribosylation factor 1 )이 *CaPP2C* 형질전환체 담배에서 높은 수준으로 발현되는 것이 확인 되었고, *NtARF1*의 전사물은 고온스트레스에 의해 발현이 유도되는 것이 확인되었다. *NtARF1*의 식물체내에서의 기능을 연구하기 위하여 *NtARF1*을 과다발현 시킨 형질전환체 담배를 제작하였다. 생체 분석 결과에서 *NtARF1* 형질전환체 담배는 대조군 식물체와 비교하여 생장률, 식물 높이 및 각각의 식물체에서 발달된 꽃의 개수가 증가하였으며 빠른 종자 발아율을 보여 주었다. 또한 비생물 스트레스 조건인 고온, 건조, 저온, 고염도에서 *NtARF1* 형질전환체 담배는 대조군 식물체와 비교하여 높은 생장률에 의해 스트레스에 대한 내성이 증가하는 것이 확인 되었다. 전체 유전체 서열이 분석된 야생식물 및 작물들의 database를 이용하여 ARF family protein을 분류하였다. 계통학적 분류를 통해 ARF family protein는 4개의 Class로 나누었으며 Class1 ARF가 모든 야생식물 및 작물들에서 가장 많이 존재하였으며 특히 야생식물과 비교하여 작물에서 Class 1 ARF가 많은 숫자가 존재하였다.

**주요어** : ADP-ribosylation factor, 비생물 스트레스, *Nicotiana tabacum*, 형질전환 식물체, 스트레스 내성 식물체, 종자 발아, 계통수

**학번** : 2010-20305



# 목차

초록 .....	i
목차 .....	iii
그림 목록 .....	v
표 목록 .....	viii
약어 .....	ix
1. 서론 .....	1
2. 1장 CaPP2C, CaMAPK1, CaBI-1 유전자가 과다발현된 형질전환 식물체의 비생물 스트레스 내성에 관한 연구	
2.1 서론 .....	5
2.2 재료 및 방법 .....	10
2.3 결과 .....	17
2.4 고찰 .....	54
3. 2장 <i>NtARF1</i> 유전자의 식물생장 및 비생물 스트레스와의 연관 관계	
3.1 서론 .....	58
3.2 재료 및 방법 .....	64
3.3 결과 .....	72
3.4 고찰 .....	106

4. 3장 야생식물과 작물들에서의 ARF의 분류 및 비교	
4.1 서론 .....	114
4.2 재료 및 방법.....	117
4.3 결과 .....	119
4.4 고찰 .....	141
5. 결론 .....	144
6. 참고문헌 .....	146
ABSTRACT .....	157

## 그림 목록

그림 1. 식물의 비생물 스트레스 반응에 대한 포괄적인 신호전달 과정 .....	3
그림 2. CaPP2C와 애기장대의 PP2C의 비교분석 .....	19
그림 3. CaMAPK1과 다른 종의 MAPK의 비교분석 .....	21
그림 4. CaBI-1과 다른 종의 BI-1의 비교분석.....	23
그림 5. <i>CaPP2C</i> 가 다양한 비생물 스트레스에서 발현이 유도되는 것을 확인한 RNA blot 결과 .....	24
그림 6. <i>CaMAPK1</i> 이 다양한 비생물 스트레스에서 발현이 유도되는 것을 확인한 RNA blot 결과.....	25
그림 7. <i>CaBI-1</i> 이 다양한 비생물 스트레스에서 발현이 유도되는 것을 확인한 RNA blot 결과.....	26
그림 8. <i>CaPP2C</i> 를 과다발현한 형질전환체 담배의 제작 및 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량 비교 분석 .....	28
그림 9. <i>CaPP2C</i> 형질전환체 담배와 vector 대조군의 비생물 스트레스에서의 생체량 비교 분석 .....	31
그림 10. <i>CaMAPK1</i> 을 과다발현한 형질전환체 담배의 제작 및 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량 비교 분석 .....	35
그림 11. <i>CaMAPK1</i> 형질전환체 담배와 vector 대조군의 비생물 스트레스 조건에서의 생체량 비교 분석 .....	37
그림 12. <i>CaBI-1</i> 을 과다발현한 형질전환체 담배의 제작 및 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량 비교 분석 .....	41
그림 13. <i>CaBI-1</i> 형질전환체 담배와 vector 대조군의 비생물 스트레스에서의 생체량 비교 분석 .....	43
그림 14. Small GTPase ARF poroteins .....	59

그림 15. 다양한 비생물 스트레스에 의해 발현이 유도되는 유전자들의 분석	62
그림 16. 담배 ARF 유전자를 분리하기 위한 cDNA library screening	74
그림 17. 담배에서 분리한 ARF cDNA clone들의 cDNA 염기서열 및 아미노산 서열의 다중 서열 정렬 결과	75
그림 18. NtARF 유전자에 대한 genomic DNA blot 분석결과	77
그림 19. NtARF1 primer의 특이성 확인을 위한 DNA-blot 분석결과	79
그림 20. CaPP2C 형질전환체 담배에서 RT-PCR을 통해 분석된 NtARF1 전사물의 발현분석	80
그림 21. 고온스트레스조건에서 NtARF1 전사물의 발현분석	81
그림 22. NtARF1을 과다발현한 형질전환체 담배의 제작	83
그림 23. NtARF1을 과다발현한 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량 및 형태 비교 분석	85
그림 24. NtARF1 형질전환체 담배와 vector 대조군의 고온 스트레스에서의 생체량 비교 분석	89
그림 25. NtARF1 형질전환체 담배와 vector 대조군의 건조 스트레스에서의 생체량 비교 분석	91
그림 26. NtARF1 형질전환체 담배와 vector 대조군의 저온 스트레스에서의 생체량 비교 분석	93
그림 27. NtARF1 형질전환체 담배와 vector 대조군의 고염 스트레스에서의 생체량 비교 분석	95
그림 28. NtARF1 형질전환체 담배와 vector 대조군의 종자의 발아비율 비교 분석	102
그림 29. CaPP2C 형질전환체 담배와 NtARF1 형질전환체 담배에서의 유전자 발현 양상	105
그림 30. 야생 식물과 작물들의 ARF family protein의 unrooted 계통수	120

그림 31. 야생 식물과 작물들의 ARF family protein의 unrooted 계통수에서 Class 1에 포함되는 ARF family protein.....	122
그림 32. 야생 식물과 작물들의 ARF family protein의 unrooted 계통수에서 Class 2에 포함되는 ARF family protein.....	123
그림 33. 야생 식물과 작물들의 ARF family protein의 unrooted 계통수에서 Class 3에 포함되는 ARF family protein.....	124
그림 34. 야생 식물과 작물들의 ARF family protein의 unrooted 계통수에서 Class 4에 포함되는 ARF family protein.....	125
그림 35. 야생식물 및 작물들에서 선별된 대표 ARF의 아미노산 서열 분석 결과 .....	126
그림 36. 야생식물 및 작물들에서 선별된 ARF의 아미노산 서열 분석 결과...	128
그림 37. 야생식물과 작물들의 ARF family protein과 ARF family gene transcript의 비교 .....	139

## 표 목 록

표 1. 전사체 분석을 통해 확인된 <i>CaPP2C</i> 형질전환체 담배에서 발현이 상향조절되는 유전자 목록 .....	47
표 2. 전사체 분석을 통해 확인된 <i>CaMAPK1</i> 형질전환체 담배에서 발현이 상향조절되는 유전자 목록 .....	48
표 3. 전사체 분석을 통해 확인된 <i>CaBI-1</i> 형질전환체 담배에서 발현이 상향조절되는 유전자 목록 .....	51
표 4. RT-PCR 분석을 위한 <i>NtARF</i> 들의 primer 서열 .....	79
표 5. <i>CaPP2C</i> 와 <i>NtARF1</i> 형질전환체 담배에서의 유전자 발현 비교를 위한 primer 서열.....	104
표 6. 계통수 분석에 의하여 분리된 야생식물과 작물들의 ARF family protein과 ARF family gene transcript의 비교 .....	138
표 7. 야생식물과 작물들의 배수성, coding gene, genome size, 염색체 개수 .....	140

## 약어

<b>ABA</b>	<b>abscisic acid</b>
<b>BFA</b>	<b>brefeldin a</b>
<b>CaMV</b>	<b>cauliflower mosaic virus</b>
<b>cDNA</b>	<b>complementary DNA</b>
<b>dCTP</b>	<b>deoxycytidine triphosphate</b>
<b>DEPC</b>	<b>diethyl pyrocarbonate</b>
<b>DNase</b>	<b>deoxynuclease</b>
<b>EDTA</b>	<b>ethylenediaminetetraacetic acid</b>
<b>kDa</b>	<b>kilo dalton</b>
<b>LiCl</b>	<b>lithium chloride</b>
<b>ORF</b>	<b>open reading frame</b>
<b>PCD</b>	<b>programmed cell death</b>
<b>PCR</b>	<b>polymerase chain reaction</b>
<b>SDS</b>	<b>sodium dodecyl sulfate</b>
<b>SSC</b>	<b>saline sodium citrate</b>

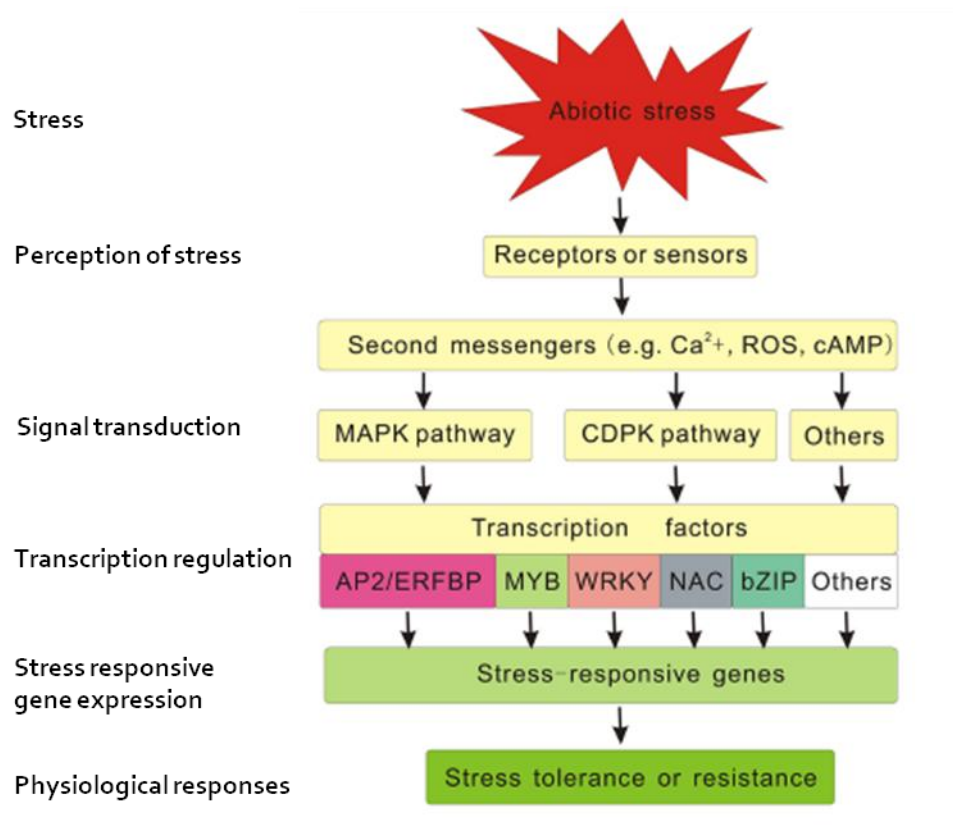
## 서론

인류의 인구수는 꾸준히 증가 중이지만 동시에 중요한 식량자원인 작물들의 생산량은 늘어나는 인구수에 비하여 경작지의 부족함과 여러 환경적인 요소 때문에 줄어 들고 있다. 작물의 생산성과 효율성을 저해하는 환경요소인 병원균, 해충들에 의한 생물학적 스트레스와 고온, 건조, 저온, 고염등에 의한 비생물 스트레스는, 식물의 생장과 발달에 부정적인 영향을 주므로 이는 작물의 생산량에 직접적인 영향을 주는 요소이며, 최근의 지구온난화 현상에 의한 기후변화는 비생물 스트레스에 의한 식물들의 피해를 증가 시키고 있다. 비생물 스트레스 요인중에 하나인 건조스트레스로 인하여 식물은 잎의 면적이 넓으면 수분이 빨리 손실되므로 잎의 확장을 제한하게 되고 이에 따라 광합성 또한 제한되게 된다(Benesova et al., 2012). 식물내의 수분함량이 감소하면 세포가 수축되며 세포벽이 이완되고 세포 부피의 변화에 따라 팽압이 감소 하게 되어 잎의 확장이나 뿌리 신장이 영향을 받는다(Skirycz and Inzé, 2010). 건조스트레스가 심할 경우 엽면적을 감소 시키기 위해 잎들은 노쇠하고 탈리하게 된다. 고온스트레스는 식물의 세포막의 안정성에 영향을 주게 되는데, 고온에 의해 막지질이 과도한 유동성을 갖게 되면 생리적 기능을 잃어 버리고 고온스트레스에 의해 엽록체와 미토콘드리아의 막이 안정성을 잃게 되어 광합성 및 호흡 또한 저해된다고 알려져 있다. 고온 스트레스는 단백질들의 정확한 folding을 저해하여 그들의 기능을 억제 시키고 더 나아가 folding 되지 못한 단백질들이 세포내에 축적되어 식물의 생장에 부정적인 영향을 주게 된다(Huang and Xu, 2008; Hasanuzzaman et al., 2013). 저온 스트레스 또한 식물의 막의 안정성에 영향을 준다. 식물세포의 막은 지질 이중층으로



구성되어있는데, 저온에서 포화지방산을 포함하는 막이 불포화 지방산을 포함하는 막보다 더 빠르게 막의 유동성이 감소하면서 세포막에 존재하는 운반체, 효소들의 수송을 조절하는  $H^+$ -ATP 가수분해효소등 내재성 막 단백질들의 활성을 억제하게 된다(Takahashi et al., 2013). 고염도 스트레스는 토양에 존재하는 과도한 양의 고염에 의해 식물의 세포내  $Na^+$ 이온의 축적으로 인한 세포내 이온농도의 불균형과 삼투압의 불균형이 일어나고, 세포내의  $Na^+$ 이온농도가 비정상적으로 높으면 효소가 불활성화되며 단백질 합성이 저해되고 엽록체에서 고농도의  $Na^+$  및  $Cl^-$  이온이 축적되면 광합성이 저해된다고 알려져 있다(Zhu, 2001; Zhang et al., 2012).

식물은 위에 설명된 비생물 스트레스조건에서 적응하며 살아가야 된다. 지속되는 스트레스에 대항하기 위하여 식물은 외부 스트레스를 감지하여 신호전달(signal transduction)을 이용하여 스트레스관련 방어 유전자들을 활성화시켜 각각의 스트레스에 반응하여 내성을 증가시키게 된다(그림 1). 그러므로 비생물 스트레스에서 발현이 유도되는 유전자의 기능과 이들을 조절하는 신호전달을 이해하는 것은 식물의 생장과 발달 및 작물의 생산량 증가에도 중요하다고 할 수 있다. 식물의 방어시스템은 우선 외부환경의 스트레스를 감지하며 시작한다. 스트레스를 감지한 식물은 2차 신호전달자인  $Ca^{2+}$ , cAMP, ROS등을 생성하고 이들은 여러 신호 전달을 활성화 시키게 된다. 신호전달 과정에서 단백질의 인산화 및 탈인산화는 단백질 키나아제 또는 단백질 인산가수분해 효소에 의해 조절되고, 신호전달을 통하여 전사인자들의 기능이 조절되어 비생물 스트레스 반응에 필요한 유전자들의 발현이 조절되게 된다(Ni et al., 2009; Wang et al., 2016). AP2/EREBP, MYB, WRKY, NAC, bZIP등의 전사인자들은



**그림 1.** 식물의 비생물 스트레스 반응에 대한 포괄적인 신호전달 과정. 식물이 비생물 스트레스를 인지한 과정에서 스트레스 반응이 이루어지기 까지 식물내에서 발생하는 신호전달 과정 (Wang et al., 2016).

비생물 스트레스에서 기능을 갖고 이들 전사인자의 과다발현은 비생물 스트레스에 대한 내성증가에 도움을 준다는 연구 결과를 확인 할 수 있다(Wang et al., 2016). 전사인자와 비생물 스트레스에 관한 연구 결과에서 대부분의 전사인자들은 서로 다른 스트레스조건에 의해 발현이 유도되어 기능을 하였지만 동일한 전사인자가 여러 비생물 스트레스조건에 의해 공통적으로 발현이 유도되는 경우가 확인 되었다(Lippold et al., 2009, Li et al., 2017). 이러한 현상은 식물의 복잡한 비생물 스트레스 반응에서 공통적으로 필요한 조절이 있기 때문에, 다양한 스트레스들에 의해 공통적으로 발현이 유도되는 전사인자 또는 스트레스 유도성 유전자들이 특정 신호전달 구성요인에 의하여 다양한 스트레스에서 공통적으로 발현이 유도되는 것이라고 생각된다.

본 연구에서 고온 스트레스를 가한 고추 식물체에서 분리한 고온 유도성 유전자인 *CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1*의 비생물 스트레스에서의 기능에 대한 연구와 이 3개 유전자들이 공통적으로 상향 조절하는 담배 ARF 유전자중에 하나인 *NtARF1*의 식물체내에서의 기능을 연구 하였다. 또한 전체 유전체 서열이 분석된 야생 식물과 주요 작물들의 database를 이용하여 계통학적 분류를 통해 이들 식물들의 ARF family protein을 분류하였다.

# 1장. CaPP2C, CaMAPK1, CaBI-1 유전자가 과다발현된 형질전환 식물체의 비생물 스트레스 내성에 관한 연구

## 서론

식물은 다양한 비생물 스트레스에 노출되어 생존해야 된다. 비생물 스트레스는 식물의 성장뿐만 아니라 작물의 생산성과 효율성 모두에 부정적인 영향을 미치게 된다. 식물은 다양한 환경 속에서 적응하며 살기 위하여 다양한 환경조건에 반응하기 위해 단백질 키나아제나 단백질 인산가수분해효소의 작용을 통해 세포 기관들을 자극 하게 된다. 여기서 단백질 인산가수분해효소는 식물 내에서 크게 tyrosine (Tyr) phosphatases와 serine/threonine (Ser/Thr) phosphatase로 나뉘어져 있다. Serine/threonine (Ser/Thr) phosphatase는 다시 phosphor-protein phosphatase (PPP)와 phosphoprotein metallophosphatase (PPM) 두 개의 클래스로 나뉘며 PP2C (protein phosphatase 2C)는 PPM family에 속한다(Singh et al., 2010). 애기장대에는 80개, 벼에는 90개의 PP2C 유전자가 존재 하며 다른 식물에도 많은 수가 보존되어있는 것으로 알려져 있다(Kerk et al., 2002; Schweighofer et al., 2004; Xue et al., 2008; Singh et al., 2010). 특이하게도 하등 식물보다 고등 식물에서 더 많은 수의 *PP2C*가 존재하는 것으로 알려져 있어, *PP2C*가 식물체 내에서의 중요한 기능을 하므로 진화과정에서 고등식물에서 더 잘 발달되어 있다고

알려져 있다(Fuchs et al., 2013). 애기장대에서 PP2C는 다양한 subfamily로 구성되어있으며 그 중 subfamily A는 ABA 신호전달 체계의 조절인자로서 알려져 있다(Sah et al., 2016). 식물 내에서 subfamily A PP2C는 일반적인 생장조건에서 SnRK2 (SNF1-related protein kinase 2)의 인산화반응을 억제하여 ABA 반응 유전자의 발현을 억제하지만 외부 스트레스에 의해 ABA가 식물 세포내에 합성되면, ABA 수용체와 ABA가 결합된 복합체가 PP2C와 상호작용하여 SnRK2의 활성화가 유도되어 ABA 반응 유전자가 발현하는 것으로 알려져 있다(Hirayama and Umezawa, 2010; Sheard and Zheng, 2013). 애기장대, 벼, 옥수수, 토마토등의 subfamily A PP2C 유전자는 ABA, 건조, 고염, 저온스트레스에 의해 발현이 유도된다(Xue et al., 2008; Singh et al., 2010; Sun et al., 2011; Wei and Pan, 2014). 애기장대 subfamily A PP2C인 ABI1과 ABI2는 ABA 신호전달을 조절하는 것으로 알려져 있으며 이들의 유전자가 기능하지 못하면 인산가수분해효소의 활성이 감소되며 ABA 민감성이 줄어들며 종자 발아의 저해와 기공개폐에 결함이 생겨 건조 내성이 감소하는 것으로 알려져 있다(Schweighofer and Meskiene, 2008). 또다른 subfamily B PP2C는 MAPK의 활성을 조절하는 것으로 알려져 있다. AP2C는 애기장대 subfamily B PP2C에 속하며 N-terminal에 kinase interaction motif를 가지고 있으며 이들은 MAPK phosphatase로서 기능을 한다. AP2C는 MPK6, MPK3 또는 MPK4등의 MAP kinase를 dephosphorylation시켜 비활성화 시키는 것으로 알려져 있다. Subfamily C PP2C에 속하는 phosphatase POL, PLL은 shoot와 root meristem의 embryo formation을 조절하는 것으로 알려져 있다. POL/PLL은 cell fate를 조절하는 유전자인 wuschel-related homeobox (WOX)의 발현을 WOX 전사인자의 발현을

촉진하여 shoot meristem을 유지하는 것으로 알려져 있다(Fuchs et al., 2013).

MAPK(mitogen-activated protein kinase) cascade는 수용체에서 전달되는 스트레스 신호를 세포내로 전달하는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 대부분의 진핵생물에서 잘 보존되어 있는 것으로 알려져 있다. MAPK와 함께 MAP3K (MAPKKK), MAP2K (MAPKK)가 MAPK cascade를 구성한다. MAPK의 활성화는 가장 먼저 MAP3K의 활성화에 의해 시작되며 활성화된 MAP3K는 MAP2K를 인산화 시켜 활성화 시킨다. 활성화된 MAP2K는 MAPK를 인산화하여 활성화 시키고(Ichimura et al., 2002; Colcombet and Hirt, 2008) 활성화된 MAPK는 많은 하위 타겟들의 활성화를 조절한다. 예를 들어, 전사인자, microtubule-associated protein의 발현, 외부 자극에 반응하는 유전자의 발현등을 활성화 시키는 것으로 알려져 있다(Neill et al., 2002; Popescu et al., 2009; Taj et al., 2010). 때문에 MAPK 활성화는 전사인자 활성화에 의한 유전자 발현의 변화와 cell division, cell growth, cell differentiation의 변화를 유도하게 된다. 애기장대는 80개의 MAP3K, 10개의 MAP2K, 20개의 MAPK가 존재하고 식물에서 MAPK는 병원체, 가뭄, 고염, 저온, wounding, 호르몬등에 의해 발현이 유도되는 되는 것으로 알려져 있으며(Colcombet and Hirt, 2008; Bigeard et al., 2015) 애기장대, 벼의 MAPK 유전자들의 과다 발현이 건조 및 고염 스트레스에 내성증가로 이어진다는 연구 결과가 보고되었다(Hoang et al., 2012; Xu and Chua, 2012; Moustafa et al., 2014). 다양한 비생물 스트레스 및 생물 스트레스 요인에 의해 활성화 되는 MAPK cascade는 서로 다른 스트레스 요인에 의해 활성화되지만 신호전달에서 동일한 MAP kinase를 공유에 의한 cross talk으로 동일한

하위 유전자의 발현을 유도하는 것으로도 알려져 있다(Taj et al., 2010).

PCD (program cell death)는 진핵생물에서 유전적으로 조절되는 반응으로 병원체 또는 스트레스 신호에 의해서 발생하는 과정이다. PCD의 주요 조절자로서 PCD를 유발하는 기능을 하는 BAX (BCL2 associated x protein)가 존재하며 BI-1(BAX inhibitor 1)은 BAX에 의해 진행되는 PCD를 억제하는 조절자로 알려져 있다. 식물의 BI-1을 과다발현한 yeast는 BAX에 의한 세포 사멸이 감소하였다(Sanchez et al., 2000). BI-1은 동물과 식물에서 모두 소포체막에 위치하며, BI-1은 스트레스에 의해 endoplasmic reticulum (ER)에 unfold protein이 축적되면 ER의 기능이 저해되어 unfolded protein response (UPR)이 유도되고 UPR은 ER내  $Ca^{2+}$ 을 세포질로 내보내 ER stress에 의한 세포사멸을 촉진하게 되는데 이때 BI-1이 ER내의  $Ca^{2+}$ 의 농도를 조절하는 것으로 알려져 있다. ER 막에 존재하는 inositol 3 phosphate receptor (IP3R)은  $Ca^{2+}$  channel로 알려져 있으며 BI-1이 IP3R과 interaction하여  $Ca^{2+}$ 의 농도를 조절하는 것으로 알려져 있다(Robinson et al., 2011). 또한 BI-1은 cellular stress에 의해 과도하게 생성된 ROS의 축적을 조절하는 것으로 알려져 있다. Nrf-2는 anti oxidant enzyme의 발현을 조절하는 전사인자로서 anti oxidant enzyme인 Heme-Oxygenase-1 (HO-1)의 발현을 조절한다(Li et al., 2014). BI-1을 과다발현한 세포는 Nrf-2의 활성이 촉진되어 HO-1의 생성이 증가되고 이는 ROS의 활성을 감소시키는 결과로 이어진다. 식물에서 BI-1 유전자는 병원체, wounding, 산화스트레스, 고온스트레스등에 의해 발현이 유도 되는 것으로 알려져 있으며(Sanchez et al., 2000; Hückelhoven, 2004; Watanabe and Lam, 2004; Watanabe and Lam, 2009) 애기장대 BI-1인 AtBI-1을 과다발현시킨 담배 BY-2 cell은  $H_2O_2$  같은 산화스트레스에

저항을 보이며 AtBI-1은 ER stress에 의한 PCD의 조절인자로서 *AtBI-1*의 과다발현은 ER stress에 대한 식물의 내성의 증가로 이어졌다(Watanabe and Lam, 2008).

*CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1*는 선행연구에서 고추 식물체에 고온스트레스를 처리한 cDNA library에서 분리된 고온 유도성 유전자이다. PP2C, MAPK, BI-1은 기존에 보고된 연구결과들에서 비생물 스트레스와 연관성을 보여주었기 때문에 고온에서 발현이 유도된 3개의 유전자가 비생물 스트레스에 기능을 할 것이라 예상하여, 본 연구에서 다양한 비생물 스트레스조건에 이들 3개의 유전자가 기능을 하는지 확인 하였다.



## 재료 및 방법

### 식물 재료 및 스트레스 처리

고추 식물체는 25°C로 유지되며 60%의 상대습도와 16시간 광주기를 갖는 생장실에서 배양하였다. 스트레스 처리 및 RNA 추출에는 5주간 배양된 식물들이 사용되었다. 고온스트레스 처리를 위하여 식물체를 42°C로 유지되며 90%의 상대 습도를 갖는 배양기에서 4시간 동안 고온스트레스를 가하였다. 건조스트레스는 토양에서 배양된 식물체를 토양에서 분리한 뒤 수분을 흡수할 수 있는 종이 위에 위치하여 12시간 동안 25°C에서 건조시켰다. 고염스트레스 처리를 위하여 배양된 식물체의 뿌리를 250 mM NaCl 용액에 담가 4시간 동안 고염스트레스를 가하였다. 저온스트레스는 16시간 광주기를 갖는 4°C의 cold room에서 24시간 동안 식물체에 저온스트레스를 가하였다. 침수스트레스는 16시간 광주기를 갖는 25°C 생장실에서 72시간 동안 식물체 전체를 물에 완전히 잠기게 하였다. ABA 처리는 배양된 식물체의 뿌리를 100  $\mu$ M ABA 용액에 담가 16시간 동안 16시간 광주기를 갖는 25°C 생장실에서 배양하여 ABA 처리를 하였다. 모든 스트레스 조건처리 후 식물체의 조직은 RNA 추출에 사용되었다. 고추식물체 이외에 형질전환체 담배 및 vector 대조군 또한 동일한 생장조건에서 배양되었고 RNA 추출에는 5주간 생장실에서 배양된 형질전환체 담배 및 vector 대조군이 사용되었다.

### RNA blot 분석

담배 및 고추의 식물조직에서 total RNA의 추출에 대해 간단히 설명하면, 각 조직을 액체질소와 함께 막자 사발에서 분쇄한 뒤 3 ml의

extraction buffer (100 mM LiCl, 100 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA, and 1% SDS)를 첨가하여 잘 섞어준다. 여기에 3 ml의 chloroform-isoamyl alcohol (24:1)를 첨가하여 vortex후 4°C의 10,000 × g 속도로 25분간 원심분리한 뒤 현탁액을 새로운 튜브에 옮겨 담는다. 새로운 튜브에 옮겨 담은 현탁액과 동일한 양의 chloroform-isoamyl alcohol (24:1)를 첨가한 뒤 위의 원심분리과정을 반복한다. 원심분리 후 현탁액을 새로운 튜브에 옮겨 담고 여기에 동일한 양의 4 M LiCl를 첨가하여 섞어준 후 -70°C에 3시간 보관한다. 이후 원심분리 후에 튜브에 생성된 pellet을 70% 에탄올로 세척한 뒤 DEPC를 처리한 증류수에 용해시킨다. 이렇게 준비된 20 µg의 total RNA를 포름알데히드가 포함된 1.2% agarose gel에 전기영동시킨 뒤 이 전기영동된 agarose gel을 nylon membrane(Amersham Hybond-N<sup>+</sup>, GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA)에 blotting한다. *CaPP2C*에 특이적인 탐침 DNA 생성을 위하여 두 개의 primer (5′ - ATGATGATGCGATCGTGTTG-3′, 5′ -TCAGATCATTTCCACCTGAA-3)를 *CaPP2C*의 cDNA 염기서열을 기초로 제작하였다. 또한 *CaMAPK1*에 특이적인 탐침 DNA 생성을 위하여 두 개의 primer (5′ - ATGGAGTGGACTCAGGGTCC -3′, 5′ - TCAACTTTCCAGGAA TTGGACT -3)가 *CaMAPK1*의 cDNA 염기서열을 기초로 하여 제작되었다. *CaBI-1*에 특이적인 탐침 DNA 생성을 위하여 두 개의 primer (5′ -ATGGAGGGTTTCACGGTCGT-3′, 5′ -CTAGTTTCTCCTCTTCTTCTTC-3)가 *CaBI-1*의 cDNA 염기서열을 기초로 하여 제작되었다. 위의 primer들을 이용해 PCR 증폭된 *CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1*의 DNA는 각각  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP로 표지되어 혼성화에 사용되었다. Blotting된 membrane은 1시간에서 2시간 동안 예비

혼성화를 거친 뒤 65°C에서 16시간 동안 혼성화시켰으며 혼성화에 사용된 용액은 1 M dibasic sodium phosphate (pH 7.2), 14% (w/v) SDS, 0.5 M EDTA (pH 8.0)를 포함하고 있다. 혼성화 후에 nylon membrane의 세척은 65°C에서 0.2X SSC와 0.1% SDS를 포함한 용액을 사용하였다. 이후에 nylon membrane은 phosphor imaging screen (BAS Storage Phosphor Screens; GE Healthcare Life sciences)에 노출시켜 혼성화 결과를 얻게 되었다.

#### ***CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1*를 과다발현한 형질전환담배 제작**

*CaPP2C*의 ORF (open reading frame)는 고추의 cDNA clon과 *Bam*HI 제한효소 서열을 포함한 두 개의 primer를 (5' -ATAT GGATCCATGATGATGCGATCGTGTTG-3' , 5' -ATATGGATCCTCAGATCATTTCCACCTGAA -3' , 밑줄은 *Bam*HI 제한효소 서열) 이용하여 PCR을 통해 증폭하였다. PCR조건은 처음 시작은 95°C에서 5 분간 주형 가닥을 변성시켰으며 이후 30 cycle을 95°C에서 30초간, 56°C에서 30초간 72°C에서 1분간 반응 시키고 마지막에 72°C에서 5분간 반응시켰다. PCR을 통해 증폭된 *CaPP2C* DNA는 *Bam*HI을 처리 후에 pBKS1-1 식물발현 벡터(Suh et al., 1994)의 CaMV 35S 프로모터 뒤에 위치하는 *Bam*HI site에 ligation 시켰다. Cloning후의 염기서열은 automated DNA sequencer (3730XI DNA Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에 의해 확인 하였으며 pBKS1-1-*CaPP2C*재조합 DNA는 *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404에 형질전환 시켰다(Horsch et al., 1985). 형질전환된 *Agrobacterium* cell을 1-2 cm로 자른 멸균된 담배 잎의 절편에 감염시켰다. 24시간 동안

공동배양을 한 뒤 담배잎의 절편을 200 mg/ml 카나마이신과 100 mg/ml cefotaxime 을 포함한 shoot 유도 배지에서 배양하였다. 배양과정에서 카나마이신에 저항성을 갖는 shoot만을 선별하여 200 mg/ml 카나마이신을 포함하는 뿌리 유도 배지에 옮겨 배양을 시작하였다. 여기서 선별된 형질전환 식물체로 추정되는 형질전환체 담배는 다시 토양으로 옮겨져 일반적인 성장환경에서 배양 후 자가수정을 통해 종자를 수확하였다. *CaMAPK1*의 형질전환체 담배 제작은 *CaMAPK1*의 ORF는 고추의 cDNA clone과 *Bam*HI 제한효소 서열을 포함한 두 개의 primer를 (5' - ATATGGATCCATGGAGTGGACTCAGGGTCC -3' , 5' - ATATGGATCCTCAACTTTCCAGGAA TTGGACT -3' , 밑줄은 *Bam*HI 제한효소 서열) 이용하여 PCR을 통해 증폭하였다. 이후 PCR을 통해 증폭된 *CaMAPK1* DNA는 *CaPP2C* 형질전환 식물체와 동일한 방식으로 pBKS1-1 식물 발현 벡터 에 ligation된 뒤 *CaPP2C* 형질전환 식물체와 동일한 방식으로 제작되었다. *CaBI-1* 형질전환체 담배는 앞선 선행연구에서 제작되었다(Isbat et al., 2009).

#### 일반생장 조건에서의 생체량분석

*CaPP2C* 형질전환체 담배, *CaMAPK1* 형질전환체 담배, *CaBI-1* 형질전환체 담배, vector 대조군은 25℃로 유지되며 60%의 상대습도와 16시간 광주기를 갖는 생장실에서 약 3주간 배양하였다. 3주간 배양된 형질전환 식물체는 생체량 분석에 사용 되었으며 본 실험은 5번 반복되었으며 한 식물체의 라인당 총 20개의 개체가 사용되었다.

### 고온스트레스에서의 생체량분석

고온스트레스 내성을 확인하기 하여 *CaPP2C* 형질전환체 담배, *CaMAPK1* 형질전환체 담배, *CaBI-1* 형질전환체 담배, vector 대조군은 일반생장 조건에서의 생체량분석과 동일한 조건에서 배양되었다. 3주간 배양된 식물체들은 44°C와 90%의 상대습도가 유지된 조건에서 2시간동안 노출시킨 뒤 25°C의 배양실에서 이틀간 회복 후 식물체의 shoot부분의 생체량을 측정하였다. 본 실험은 5번 반복되었으며 한 식물체의 라인당 총 20개의 개체가 사용되었다.

### 건조스트레스에서의 생체량분석

건조스트레스 내성을 확인하기 하여 *CaPP2C* 형질전환체 담배, *CaMAPK1* 형질전환체 담배, *CaBI-1* 형질전환체 담배, vector 대조군은 일반생장 조건에서의 생체량분석과 동일한 조건에서 배양되었다. 3주간 배양된 식물체들은 25°C의 배양실에서 15일 동안 물 공급을 중단하였고 15일 후 동일한 양의 물을 공급하여 25°C의 배양실에서 이틀간 회복 후 식물체의 shoot부분의 생체량을 측정하였다. 본 실험은 5번 반복되었으며 한 식물체의 라인당 총 20개의 개체가 사용되었다.

### 저온스트레스에서의 생체량분석

저온스트레스 내성을 확인하기 하여 *CaPP2C* 형질전환체 담배, *CaMAPK1* 형질전환체 담배, *CaBI-1* 형질전환체 담배, vector 대조군은 일반생장 조건에서의 생체량분석과 동일한 조건에서 배양되었다. 3주간 배양된 식물체들은 16시간 광주기를 갖는 4°C의 cold room에서 4일동안 노출시킨 뒤 25°C의 배양실에서 이틀간 회복 후 식물체의 shoot부분의

생체량을 측정하였다. 본 실험은 5번 반복되었으며 한 식물체의 라인당 총 20개의 개체가 사용되었다.

### 고염스트레스에서의 생체량분석

고염스트레스 내성을 확인하기 하여 *CaPP2C* 형질전환체 담배, *CaMAPK1* 형질전환체 담배, *CaBI-1* 형질전환체 담배, vector 대조군의 종자를 각각 0 mM NaCl, 50 mM NaCl, 100 mM NaCl, 200 mM NaCl이 포함된 MS 배지에서 15 일간 25°C로 유지되며 60%의 상대습도와 16시간 광주기를 갖는 배양기에서 배양하였다. 15일후 식물체의 생체량 및 뿌리길이를 측정 하였으며 본 실험은 5번 반복되었으며 한 식물체의 라인당 총 20개의 개체가 사용되었다.

### 전사체 분석

전사체(transcriptome) 분석을 위한 microarray 실험에는 일반 생장 조건에서 5주간 배양된 대조군 식물체와 RNA blot 분석으로 형질전환 식물체가 확인된 *CaPP2C* 형질전환체 담배 (#8), *CaMAPK1* 형질전환체 담배(#8), *CaBI-1* 형질전환체 담배(#2)가 사용되었다. 각각의 식물체들에서 추출된 100 µg total RNA는 *Arabidopsis* 27K Oligo Microarray (GreenGene Bio tech)를 활용한 microarray 실험에 사용되었으며 여기서 추출된 mRNA에 Cy3-dCTP 또는 Cy5-dCTP를 첨가하여 역전사 반응(reverse transcription reaction)을 수행하여 microarray 혼성화(microarray hybridization)용 탐침자를 제조하였다. 제조된 탐침자로 microarray chip 상에서 혼성화를 실시하여 형광분석을 수행하였으며 자세한 microarray 실험과정은 Zeba et al. (2009) 에 기술되어 있으며 GreenGene Bio tech에서 본 실험을 수행하였다.

Microarray 실험 결과에서 vector 대조군과 3개의 형질전환체 담배를 비교하였을 때 2.5 fold change 이상을 보이는 유전자를 상향조절된 유전자로 결정 하였으며 본 실험은 총 3번의 반복실험이 수행되어 얻어진 평균 결과이다.

### 아미노산 서열 분석과 비교

애기장대 및 다양한 식물에서 PP2C, MAPK, BI-1의 아미노산 서열 정보를 얻기 위하여 *A. thaliana*의 database인 (TAIR10, <https://www.arabidopsis.org>)와 그 외의 식물 종의 database인 (Phytozome, <http://www.phytozome.net>)을 활용하였다. 아미노산 서열의 Multiple sequence alignment는 Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)에 의해 수행되었으며 아미노산 서열의 비교분석에는 National Center for Biotechnology Information platform (NCBI)의 BLASTP가 이용되었다. Clustal W을 통해 분석된 아미노산 서열을 활용하여 MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013)을 이용한 neighbor joining 방식으로 계통수를 제작하였다.

## 결과

### CaPP2C, CaMAPK1, CaBI-1의 아미노산 서열 비교분석

고온 스트레스에 발현이 유도되는 유전자인 CaPP2C, CaMAPK1, CaBI-1의 아미노산 서열을 각각 다른 종에 해당되는 PP2C, MAPK, BI-1의 아미노산 서열과 비교 분석하였다. CaPP2C의 아미노산 서열을 애기장대에 존재하는 10개의 PP2C subfamily에서 각 group을 대표하는 아미노산 서열들과 비교 분석한 결과, 애기장대 Group D PP2C는 CaPP2C의 아미노산 서열과 비교하여 약 70%의 유사성을 보이는 것이 확인되었으며 다른 group과 비교하였을 경우에는 최저 25%에서 최대 40%의 아미노산 서열의 유사성을 보이며 계통수 분석 결과에서 CaPP2C가 애기장대에서 분류된 Group D PP2C와 유사성이 높은 것을 확인 할 수 있었다(그림 2A, B). CaPP2C와 9개의 애기장대 Group D PP2C의 아미노산 서열을 비교한 결과에서 유사성이 높은 것을 확인 할 수 있다(그림 2C). CaMAPK1의 아미노산 서열을 *A. thaliana*, *B. distachyon*, *O. sativa*, *G. max*, *S. lycopersicum*, *Z. mays*의 MAPK 아미노산 서열과 비교한 결과, CaMAPK1은 다른 식물에서의 MAPK와 아미노산 서열의 유사성이 있는 것이 확인 되었으며 특히 *S. lycopersicum*의 MAPK와 71%의 유사성을 보였다(그림 3A, B). CaBI-1의 아미노산 서열을 *A. thaliana*, *B. distachyon*, *G. max*, *O. sativa*, *S. lycopersicum*, *S. cerevisiae*, *H. sapiens*의 BI-1 아미노산 서열과 비교한 결과, CaBI-1은 다른 식물 종들의 BI-1과 아미노산 서열의 유사성이 65% 이상으로 확인 되었으며 특히 *S. lycopersicum*의 BI-1과는 92%의 유사성을 보였다(그림 4A, B).



### 비생물 스트레스에 연관된 CaPP2C, CaMAPK1, CaBI-1 유전자

*CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1*의 cDNA clone은 고온 스트레스를 가한 고추의 cDNA library에서 분리하였다. 다양한 비생물 스트레스 조건에서 각각의 유전자의 전사물의 발현을 분석한 결과, *CaPP2C*는 고온스트레스에서 유도되는 것이 확인되었다(그림 5). 42℃의 고온스트레스를 고추에 가한 1시간 후 *CaPP2C*의 발현이 유도되는 것이 확인 되었고 4시간까지 그 발현이 지속적으로 유도되는 것이 확인 되었다(그림 5A). *CaPP2C*는 고온 스트레스 이외에 침수 스트레스 및 중금속 스트레스에서도 발현이 유도되는 것이 확인되었으며, 스트레스 호르몬으로 알려진 ABA를 고추에 처리한 후 3시간부터 *CaPP2C*가 발현이 유도되어 48시간까지 발현이 유도되는 것이 확인 되었다(그림 5B-D).

*CaMAPK1*은 고온스트레스에서 발현이 유도되는 것이 확인되었다. 42℃의 고온스트레스를 고추에 가한 1시간 후 *CaMAPK1*의 발현이 유도되었고 3시간까지 지속적으로 발현이 유도되다가 4시간 후에는 발현이 유도되지 않는 것이 확인 되었다(그림 6A). 고온스트레스와 마찬가지로 건조스트레스에서 *CaMAPK1*의 발현이 유도되는 것이 확인 되었고, 고염 스트레스 조건에서 *CaMAPK1*은 스트레스 처리 후 30분부터 점진적으로 발현이 유도되어 4시간이 되는 지점에서 가장 많은 발현이 유도되었다(그림 6B, C). 또한 저온 스트레스에서 역시 *CaMAPK1*의 발현이 유도되어 스트레스 처리 4시간후에서 가장 많은 발현이 유도되며 점진 적으로 발현 양이 감소되었다(그림 6D).

*CaBI-1* 역시 다양한 비생물 스트레스에 의해 발현이 유도되는 것

A

CsP2C	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GroupA(ATg29380)	MAEICYEVVDACPSVYESTPAHSRRRPFQVTMHEDWEKNCKRSKQE	49								
GroupB(ATg08260)	MEQGTDPYGEIEISFGYQCNKKIGIPEDKIADGREVLGGFRLOKTSSFCLSGAALSGNPTLANTNLCNGVIGSEILPSLSPKSRKVPSPSPALSCLD	100								
GroupC(ATg16560)	MLRALAR	7								
GroupD(ATg493920)	MGHCFSLPSSSQSEIH	15								
GroupE(ATg23360)	MGFLDLPFMLKAF	13								
GroupF(ATg21470)	MAPYTEVSPMINTLEVADDKMTNLSSSGKPPRNISAMRHCSNTA	44								
GroupG(ATg09160)	MSVSKASRTQHSLV	14								
GroupH(ATg25070)	MGTYLSS	7								
GroupI(ATg63320)	MVELRQFSOLPIALSISIRIADSPSPPPVVAI	32								
CsP2C	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
GroupA(ATg29380)	PICRFGRINGDGLLWHMDLKPASGDFSIIVVQANSLSLEDD	84								
GroupB(ATg08260)	ALATRYSSIPRSSREDFSDQNVDSPPRYGSSVCGRRREMEDAVA	134								
GroupC(ATg16560)	MDRFSAITN	1								
GroupD(ATg493920)	ISPLHSGSMVSLSCSSSTSPSPPEPESCYITSMSSPSSVNEGFLLSAMEVQVAGGAEDRVQVCSENGWLFCAIYDFGN	158								
GroupE(ATg23360)	PIERCLGSRASGGLLWQSELPHAGGDYSIAVQANSRLDD	84								
GroupF(ATg21470)	EDNEHGDNVVCYGEFFGLDQDLPHVHRLGSVCSIGTKVNLQD	96								
GroupG(ATg09160)	RFRRLVVEGDKRRKKKPLWLTPVSHGYTTVDRLSYADNSND	129								
GroupH(ATg25070)	WITQYEGDERFGAKSPGQVNSTFQPVFRSGWSXGPKQSMED-EF	91								
GroupI(ATg63320)	PLATILIGELRSSEKVEKPFVYQGAALAKKGEDYFLIKTDCEER	95								
GroupA(ATg29380)	PXTEKLSDEGDNKLRFG	7								
GroupB(ATg08260)	RRRFRGGGNTRRIVFSVPLIFAFPPPTGTGPKDVLVGIAAVFDG	117								
CsP2C	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
GroupA(ATg29380)	LHKFSKEQGLSSDVIKRAFSAI	144								
GroupB(ATg08260)	LVQEELSSDMEDEEWKTTMERSFTRMD	205								
GroupC(ATg16560)	IVFEVVDATFLKEGFKG	7								
GroupD(ATg493920)	IVFHLQLLDRMKQTKSDDDGKLELLSNISNVDSYSDLFRRQG	291								
GroupE(ATg23360)	MHKFAREHGLSDVDIKKAFKET	144								
GroupF(ATg21470)	LALKEELNQSNEVCEEASKWEK	161								
GroupG(ATg09160)	LPNELGIMRKKCTMRRAVVEE	139								
GroupH(ATg25070)	VMEKHFPSTSKATRSFAFKTD	181								
GroupI(ATg63320)	VVSAIPQASRDWELQALPRALVAG	147								
GroupA(ATg29380)	MLHYDLSQRFDSSLPNLFHLDILKEALLR	183								
CsP2C	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
GroupA(ATg29380)	ANLGDRAVLGRSSFDGKSS-VIAERLSTDH	207								
GroupB(ATg08260)	ANLGDRAVLGRNGKPPVPEST	255								
GroupC(ATg16560)	SNAGDGRVMSVG-EMMNGK	113								
GroupD(ATg493920)	ANLGDRAVLATYMNKKLQAVQLT	247								
GroupE(ATg23360)	ANLGDRAVLG-SVVSQVDSKKGAVARLSTDH	216								
GroupF(ATg21470)	ANLGDRAVLGTMTEDEGKAVQLTS	226								
GroupG(ATg09160)	ASLGDHVVVCKDGAHQRRD	178								
GroupH(ATg25070)	ASLGDRAVLGRGRIAEISK	218								
GroupI(ATg63320)	ASLGDSCILDTQGGVVSILT	205								
GroupA(ATg29380)	ASLGDSCILSRKQAYNLISK	212								
GroupB(ATg08260)	ASLGDSCILCSERYETPEAKATLIKLYRERKNQDSSPSRFSDLKLEHRTGLMRFIKELTK	277								
CsP2C	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
GroupA(ATg29380)	G--IIQGG-M	215								
GroupB(ATg08260)	G--VLAASAAGONYLP	324								
GroupC(ATg16560)	G--SVVPPGIGDAOLK	174								
GroupD(ATg493920)	G--KIKVTRALGVGYLKEKLN-DALMGILVRNLLSPYVS	400								
GroupE(ATg23360)	G--IIQVSSIGGVYLPXEYRDPFQRHGNPIPLRRPAMTAEISIVRKLPQDLFLFASDGLWEHLSDETVEIIVLKKHPRGIARRLVRAAL	242								
GroupF(ATg21470)	QNIPOGASAFQDFRLDHG	239								
GroupG(ATg09160)	G--GEEDESOPRN	232								
GroupH(ATg25070)	G--OLSVIALGQWHITGK	296								
GroupI(ATg63320)	CWPGGCLRSIGTDVGE	284								
GroupA(ATg29380)	G--SINLTRAIGMEFYQNK	293								
GroupB(ATg08260)	G--OLAVSISIGLTYR SYG	241								
CsP2C	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
GroupA(ATg29380)	DPALSDKACTE--ASVLTIKLALANSSNVSVVITDTRR	361								
GroupB(ATg08260)	TEKPLLLA--ACKKIVDLSASGSFODISVMLIPRQFV	212								
GroupC(ATg16560)	ERLVAKAAARAGFTLEELTNVPAGRRTRYHODVTIMVITGTQRTS	487								
GroupD(ATg493920)	EEAAKKREMRY--GDIKKIAGKIRRFHODVTIMVITQDNKTS	345								
GroupE(ATg23360)	QASAAKMVAE--AAEAWKRRKYTKVDITVILCLFQNKQEPS	331								
GroupF(ATg21470)	KE--AAKCAKEALNTISKSSIICVITRFG	260								
GroupG(ATg09160)	GLKDDTTCVVVDIVPSGHLSLAPAMKKQNPTSFSLSRKNHMDTNKNGKNSAVGVVEELFEESAVLADR	384								
GroupH(ATg25070)	ETKLSVTCEKV--VDRCKAPDTATGEGGMMITLVQFKKPNSE	336								
GroupI(ATg63320)	TSFGAGVPSYCSISLSDCLVNTAFEGSMNMAAVVPSKSLNDWE	397								
CsP2C	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
GroupA(ATg29380)	KASTFV	493								
GroupB(ATg08260)	SNKSLVKQGGITAPPDYISLHSDAEAEQRLLNLVLY	380								
GroupC(ATg16560)	IEIPKSHKRRSISAEGLDLKGVNL	361								
GroupD(ATg493920)	LSNNGGSISSASKRWEGPFLCTICKKKDAEGRKPSKGSVTT	428								
GroupE(ATg23360)	TEPEDSKPESEDEPSSS	355								
GroupF(ATg21470)	SOPKESQVSGPSGFMKNYALPCEFLSSQPNLFRMG	423								

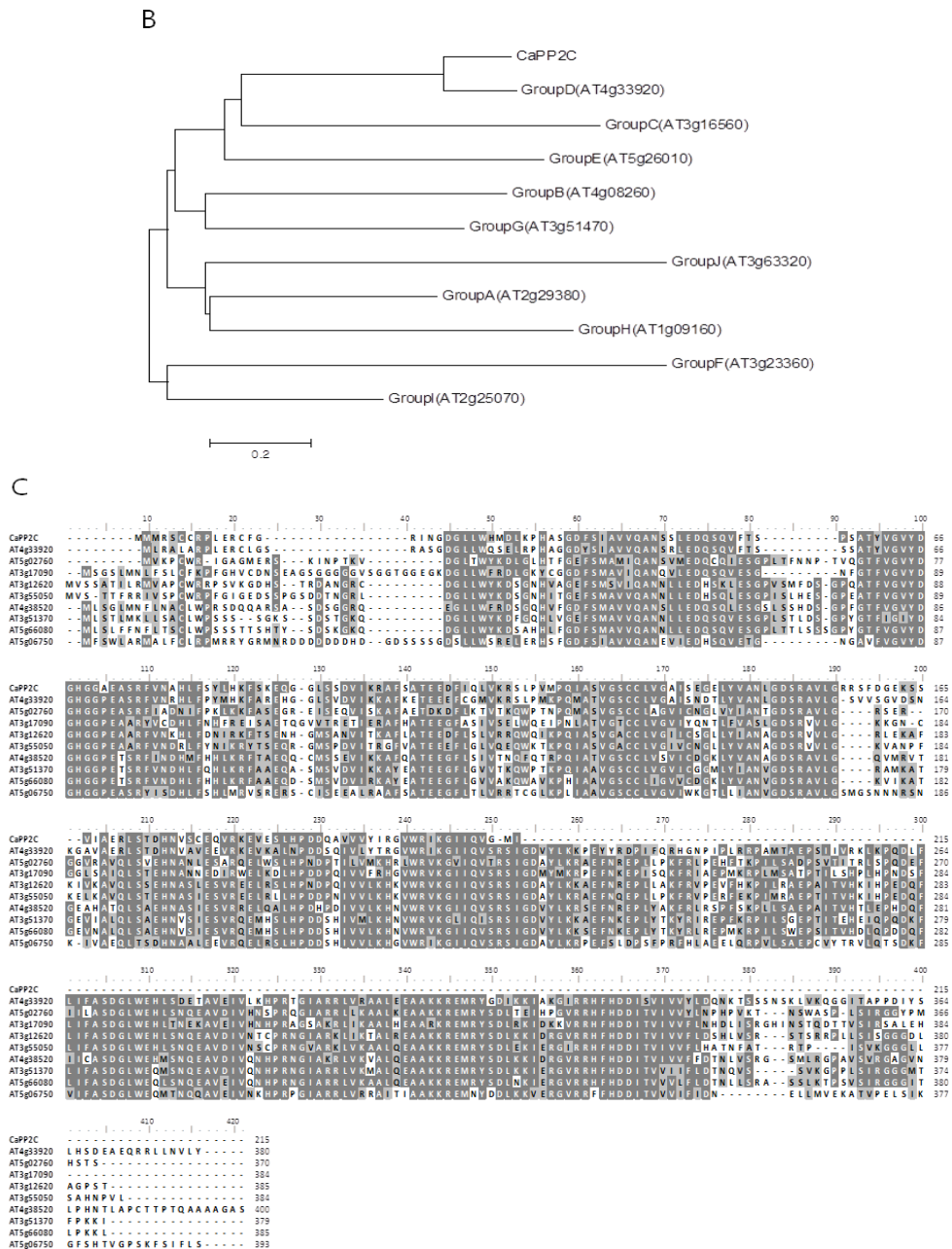
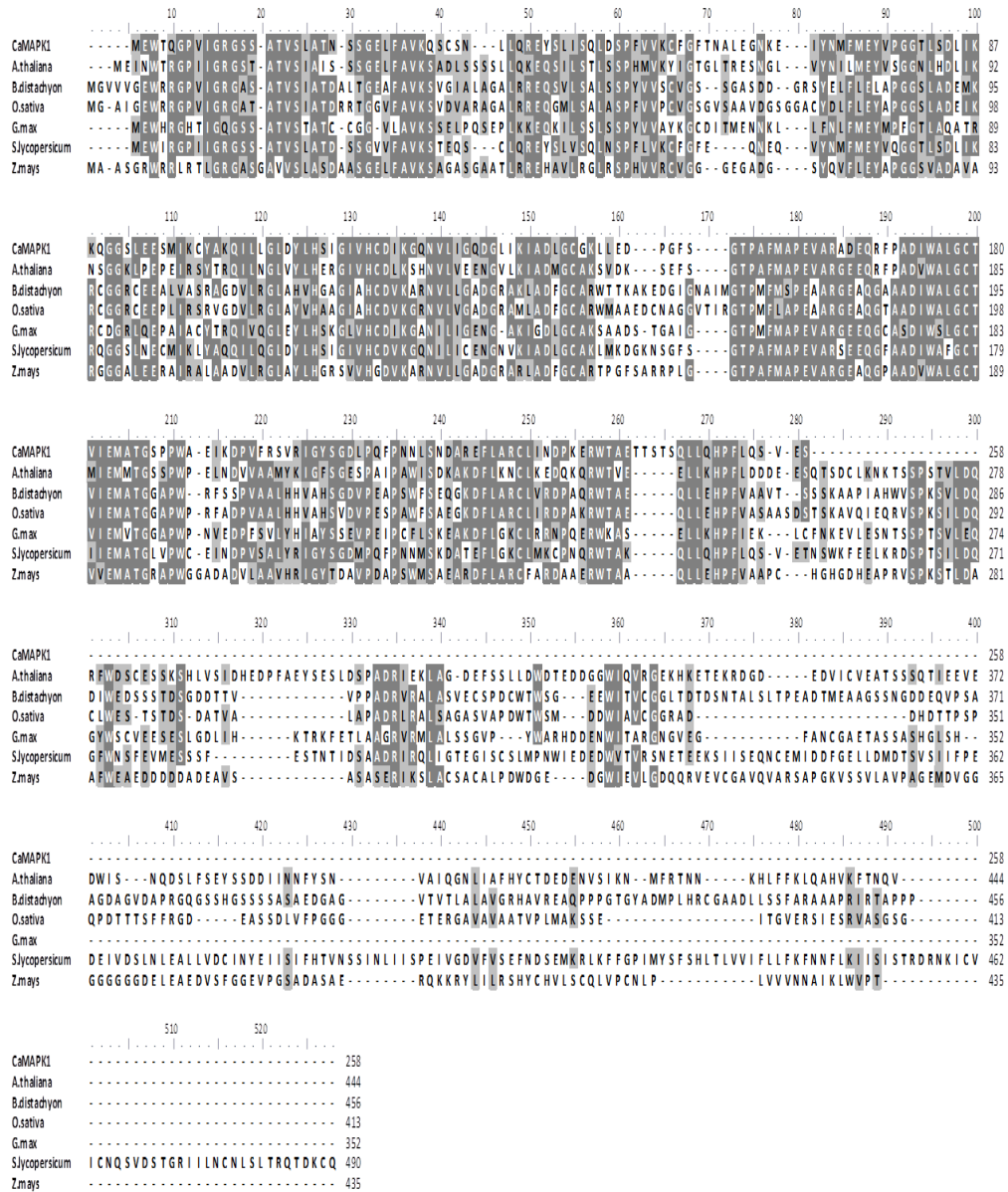
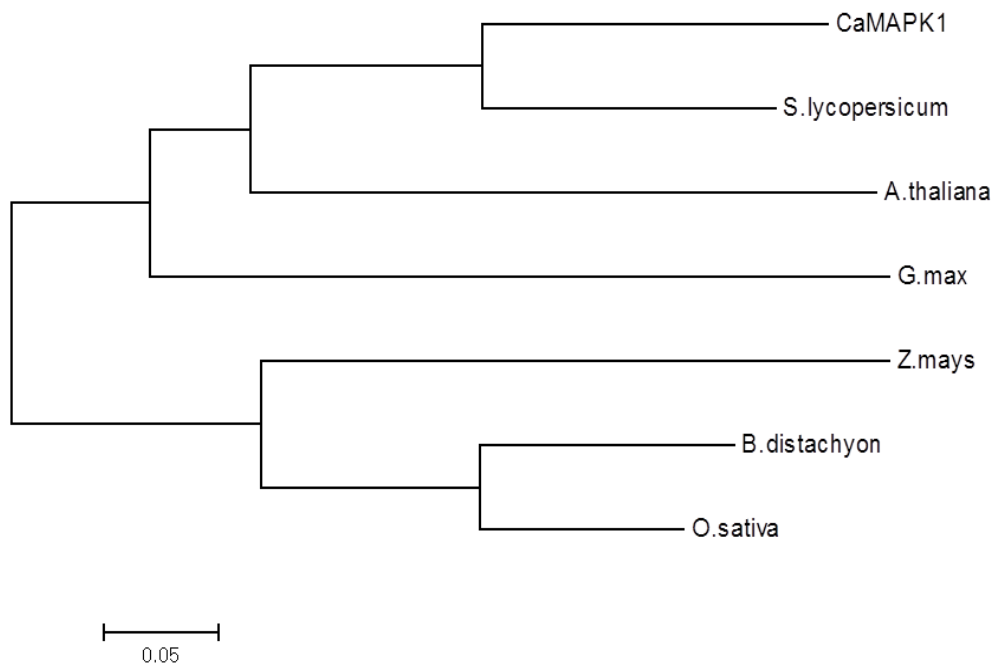


그림 2. CaPP2C와 애기장대의 PP2C의 비교분석. A) CaPP2C와 애기장대의 10개의 subfamily의 대표 PP2C의 아미노산 서열 비교결과. B) CaPP2C와 애기장대의 10개의 PP2C subfamily의 unrooted 계통수 분석결과. C) CaPP2C와 애기장대 subfamily D PP2C 간의 아미노산 서열 비교결과.

A



B



**그림 3.** CaMAPK1과 다른 종의 MAPK의 비교분석. A) CaMAPK1과 *A. thaliana*, *B. distachyon*, *O. sativa*, *G. max*, *S. lycopersicum*, *Z. mays*의 MAPK의 아미노산 서열 비교결과. B) CaMAPK1과 다른 종의 MAPK의 unrooted 계통수 분석결과.



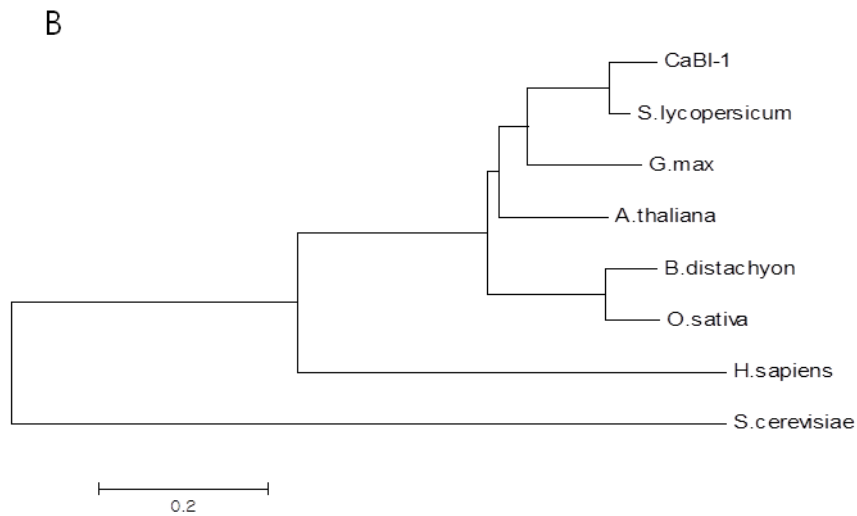
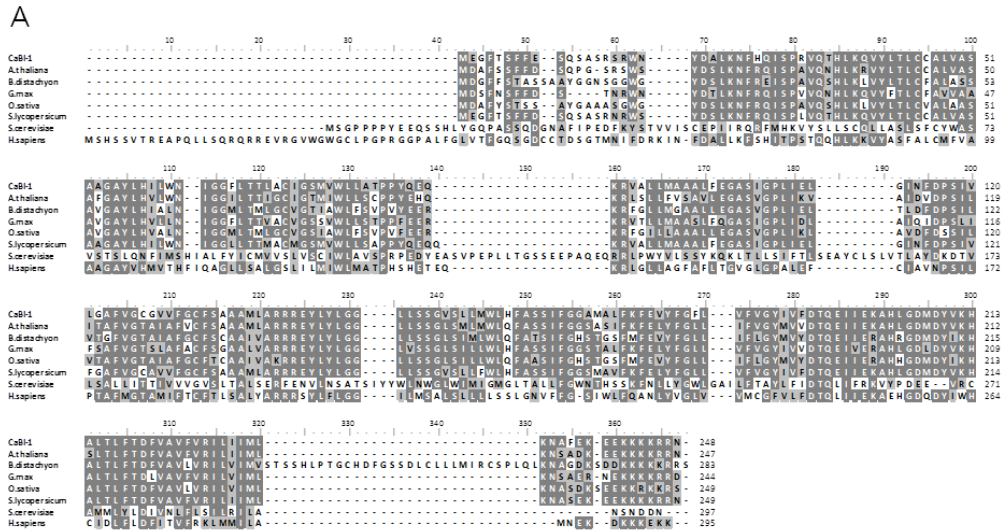


그림 4. CaBI-1과 다른 종의 BI-1의 비교분석. A) CaBI-1과 *A. thaliana*, *B. distachyon*, *G. max*, *O. sativa*, *S. lycopersicum*, *S. cerevisiae*, *H. sapiens*의 BI-1의 아미노산 서열 비교결과. B) CaBI-1과 다른 종의 BI-1의 unrooted 계통수 분석결과.

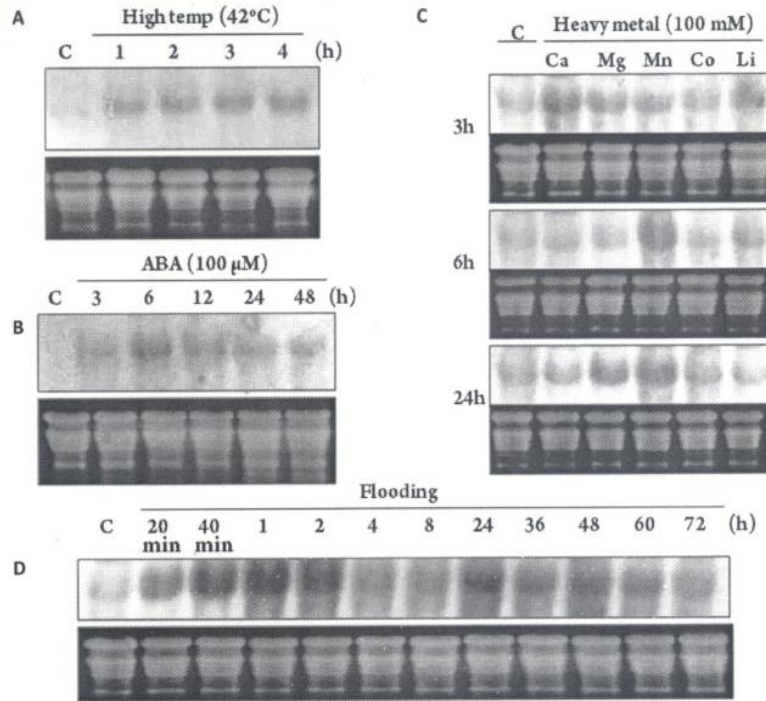


그림 5. *CaPP2C*가 다양한 비생물 스트레스에서 발현이 유도되는 것을 확인한 RNA blot 결과. A) 고추 식물체에 42°C 고온스트레스를 가한 결과에서 *CaPP2C*는 스트레스를 가한 1시간 후부터 지속적으로 발현이 유도된다. B) 고추 식물체에 100  $\mu$ M ABA를 처리한 결과에서 ABA 처리 3시간 후부터 *CaPP2C*의 발현이 유도되어 6시간째에 발현이 강하게 유도되고 이후에 발현이 감소하였다. C) 고추 식물체에 다양한 중금속스트레스를 가한 결과에서  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{LiCl}$  처리 후 *CaPP2C*가 발현이 유도되는 것이 확인되었고  $\text{CoCl}_2$ 를 처리한 결과에서 *CaPP2C*는 발현이 유도되지 않았다. D) 고추 식물체에 침수 스트레스를 가한 결과에서 *CaPP2C*가 발현이 유도되어 침수스트레스 2시간 후까지 발현이 강하게 유도되며 이후에는 점진적으로 발현량이 감소하였다. RNA blot 분석 결과에는 실험에 사용된 식물체에서 추출한 20  $\mu$ g의 total RNA를 1.2% agaros gel에 전기영동하였으며 EtBr staining 하였다(Isbat et al., 2009).

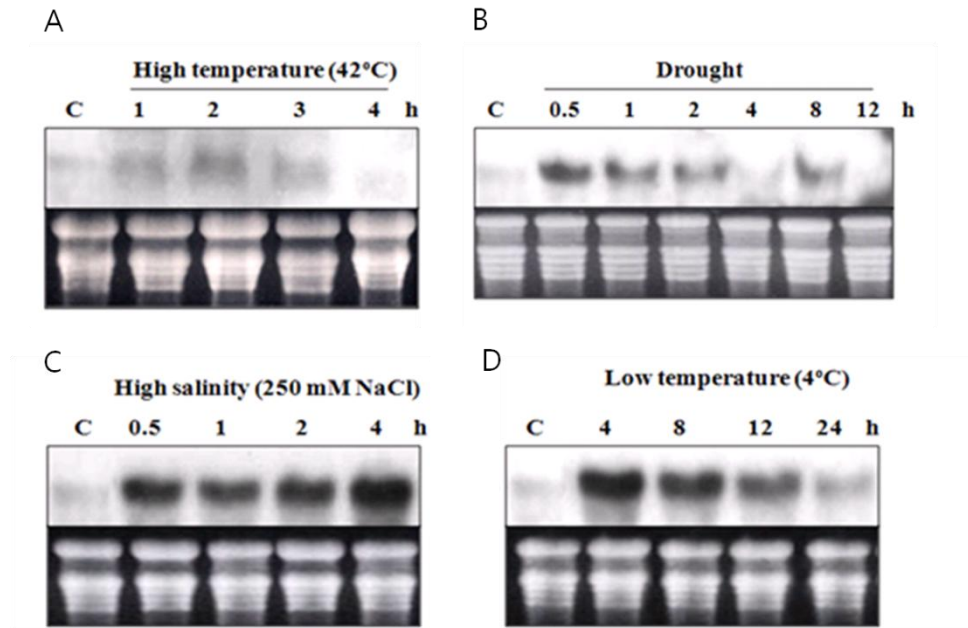


그림 6. *CaMAPK1*이 다양한 비생물 스트레스에서 발현이 유도되는 것을 확인한 RNA blot 결과. A) 고추 식물체에 42°C 고온스트레스를 가한 결과에서 *CaMAPK1*는 스트레스를 가한 1시간 후 발현이 유도되어 2시간 후까지 발현양이 증가하고 이후에는 발현양이 감소하였다. B) 고추 식물체에 건조 스트레스를 가한 결과에서 *CaMAPK1*는 건조스트레스를 처리한 30분 후부터 강하게 발현이 유도되며 이후로 발현이 감소되는 것이 확인되었다. C) 고추 식물체에 고염스트레스를 가한 결과에서 스트레스를 가한 30분 후부터 *CaMAPK1*의 발현이 유도되어 스트레스 처리후 4시간에서 가장 강하게 발현이 유도된다. D) 고추 식물체에 저온스트레스를 가한 결과에서 *CaMAPK1*는 스트레스를 처리한 4시간후에 강하게 발현이 유도되며 이후에는 점진적으로 발현양이 감소되었다. RNA blot 분석 결과에는 실험에 사용된 식물체에서 추출한 20  $\mu$ g의 total RNA를 1.2% agaros gel에 전기영동하였으며 EtBr staining하였다.



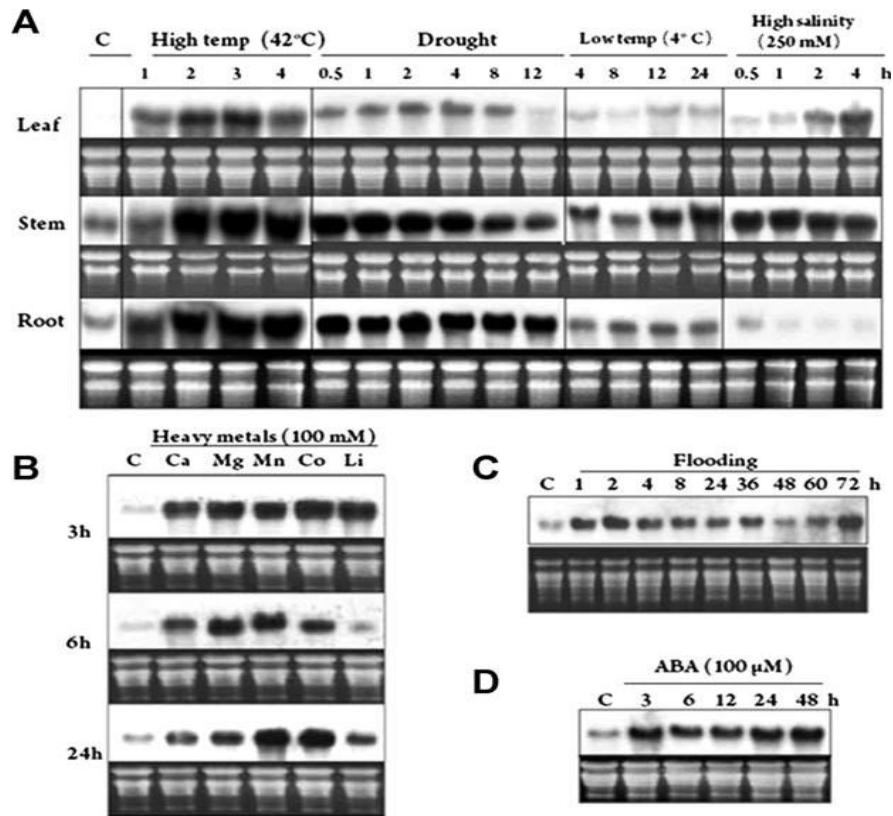
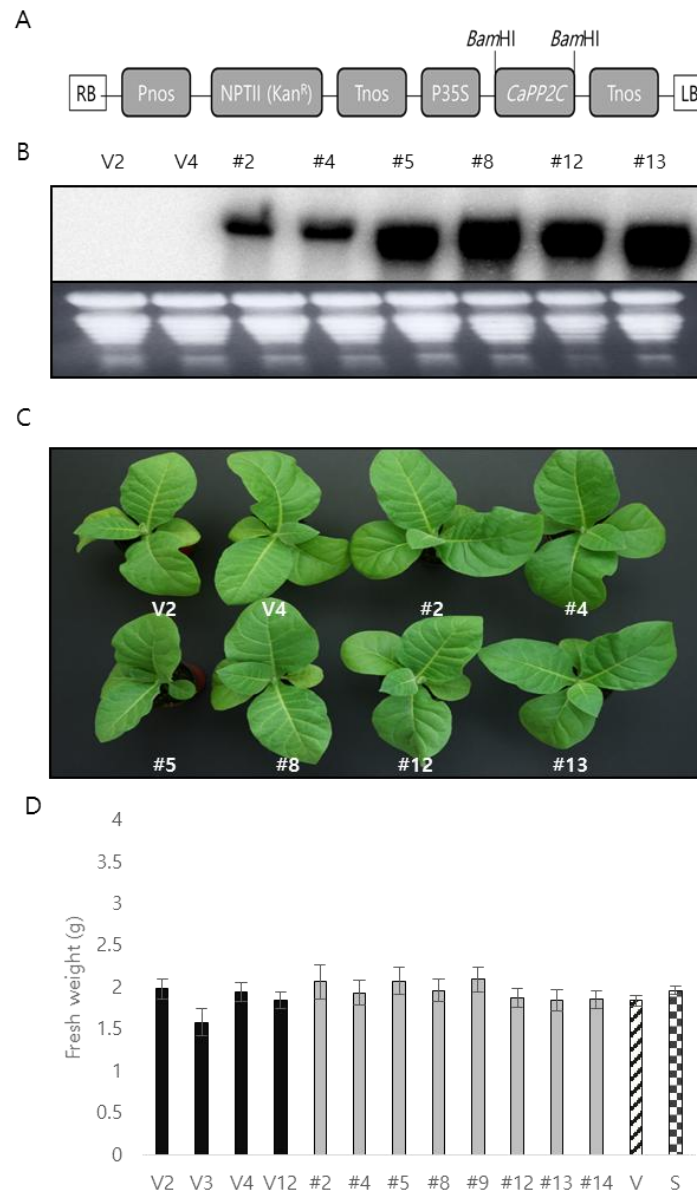


그림 7. *CaBI-1*이 다양한 비생물 스트레스에서 발현이 유도되는 것을 확인한 RNA blot 결과. A) 고추 식물체에 고온, 건조, 저온, 고염스트레스를 가한 결과에서 잎, 줄기, 뿌리에서 모두 *CaBI-1*의 발현이 유도된다. B) 고추 식물체에 다양한 중금속스트레스를 가한 결과에서 *CaBI-1*의 발현이 유도되었다. C) 고추 식물체에 침수 스트레스를 가한 결과에서 *CaBI-1*의 발현이 유도된다. D) 고추 식물체에 100  $\mu$ M ABA를 처리한 결과에서 ABA 처리 3시간 후부터 *CaBI-1*의 발현이 유도되어 48시간까지 발현이 이루어진다. RNA blot 분석 결과에는 실험에 사용된 식물체에서 추출한 20  $\mu$ g의 total RNA를 1.2% agaros gel에 전기영동하였으며 EtBr staining하였다(Isbat et al., 2009).

이 확인되었다(그림 7). 42℃의 고온스트레스를 고추에 가한 결과, *CaBI-1*은 고추의 잎에서 1시간 뒤에 발현이 유도되며 3시간까지 그 발현이 점진적으로 강하게 유도되다가 이후에는 발현이 감소하는 것이 확인 되었다. *CaBI-1*은 고온스트레스 이외에 건조, 저온, 고염도, 침수, 중금속 스트레스 및 ABA를 고추에 처리하였을 때 발현이 유도되는 것이 확인 되었다(Isbat et al., 2009).

### ***CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1* 과다발현시 비생물 스트레스에 관한 내성**

*CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1*들은 다양한 비생물 스트레스에 의해 발현이 유도 된다는 것이 확인 되었다. 이 결과를 토대로 *CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1*이 비생물 스트레스에서 기능을 가질 것이라 예상하여 *CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1*의 각각의 ORF를 식물 발현 벡터인 pBKS1-1에 각각 서브 클로닝하여 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환으로 담배에 과다발현 시켰다. *CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1*의 각각의 ORF를 과다발현 시킨 *CaPP2C* 형질전환체 담배와 *CaMAPK1* 형질전환체 담배 그리고 *CaBI-1* 형질전환체 담배로 추정되는 식물체들은 카나마이신을 포함하는 MS 배지에서 선별 후 다시 각각의 유전자를 <sup>32</sup>P로 표식한 탐침DNA를 사용한 RNA blot분석으로 형질전환이 되었는지 확인 하였다. 카나마이신을 포함하는 배지에서 선별된 *CaPP2C* 형질전환체 담배들은 *CaPP2C* 탐침DNA를 이용한 RNA blot 결과에서 모두 *CaPP2C*를 대조군 식물체와 비교하여 과다 발현 하고 있는 것이 확인 되어 이 형질전환체 담배의 생체분석을 수행하였다 (그림 8A-C). 일반적인 생장 조건에서 20일간 생장한 *CaPP2C* 형질전환체 담배의 생체량 비교결과에서 *CaPP2C* 형질전환체 담배의 생체량은  $1.96 \pm 0.05$  g, vector 대조군은  $1.84 \pm 0.07$  g이 측정되어 *CaPP2C* 형질

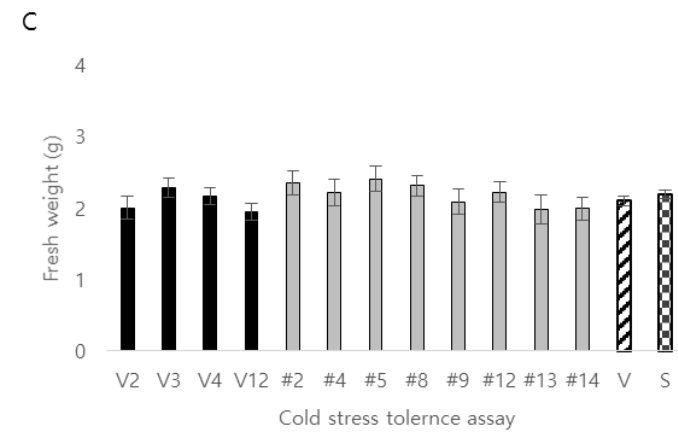
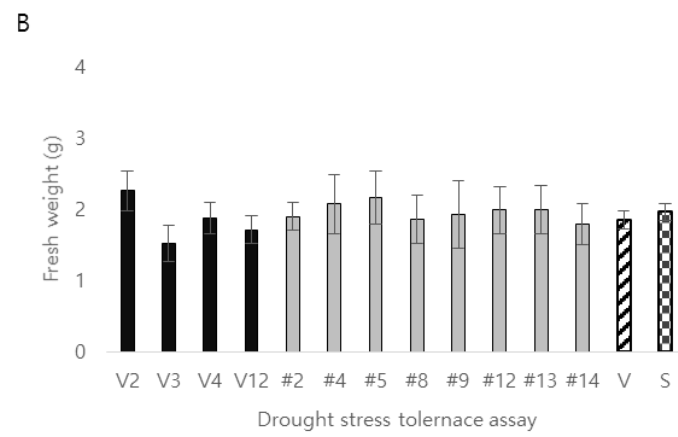
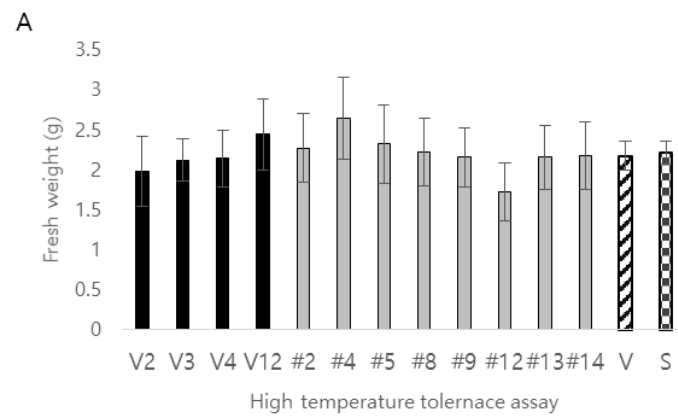


**그림 8.** *CaPP2C*를 과다발현한 형질전환체 담배의 제작 및 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량 비교 분석. A) *CaPP2C* 유전자를 식물체에서 과다발현시키기 위해 사용된 식물 발현 벡터 pBKS1-1/*CaPP2C*의 유전자 지도이다. Pnos, nopaline synthase 유전자의 promoter; NPT, neomycin phosphotransferase 유전자; P35S, cauliflower mosaic virus 35S

transcript의 promoter; Tnos, nopaline synthase 유전자의 terminator; Kan<sup>R</sup>, kanamycin resistance gene; RB, T-DNA right border; LB, T-DNA left border. B) T<sub>2</sub> 세대의 *CaPP2C* 형질전환체 담배에서 *CaPP2C*가 강하게 발현이 되는 것을 RNA blot 분석을 통해 확인하였다. RNA blot 분석 결과에는 실험에 사용된 식물체에서 추출한 20 µg의 total RNA를 1.2% agarose gel에 전기영동하였으며 EtBr staining하였다. V는 vector 대조군을 의미하며 숫자는 *CaPP2C* 형질전환체 담배의 line 번호를 의미한다. C) *CaPP2C* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 형태적 비교 결과이다. D) 일반생장 조건에서 약 20일간 배양한 *CaPP2C* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량 비교 분석 결과이다. 그래프 우측의 V는 vector 대조군 line들의 평균 생체량 값을 의미하며 S는 *CaPP2C* 형질전환체 담배 line들의 평균 생체량 값을 의미한다. 오차막대는 95% 신뢰구간을 의미한다.

전환체 담배의 생체량이 vector 대조군과 비교하여 통계적인 차이가 없었다(그림 8D). 그리고 다양한 비생물 스트레스조건에서 수행된 생체량 비교결과 중, 고온 스트레스조건에서 *CaPP2C* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량은  $2.21 \pm 0.14$  g과  $2.17 \pm 0.18$  g이 측정되었고(그림 9A), 건조 스트레스 조건에서 *CaPP2C* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량은  $1.96 \pm 0.12$  g과  $1.84 \pm 0.13$  g이 측정되었다(그림 9B). 저온 스트레스 조건에서 생체량을 측정한 결과, *CaPP2C* 형질전환체담배와 vector 대조군의 생체량은  $2.21 \pm 0.06$  g과  $2.11 \pm 0.07$  g이 측정되어(그림 9C) 위의 3가지 비생물 스트레스 조건에서 vector 대조군과 비교하여 *CaPP2C* 형질전환체 담배의 생체량이 통계적인 차이를 보이지 않았다. 고염스트레스 조건중 0 mM NaCl에서 *CaPP2C* 형질전환체 담배의 생체량과 뿌리 길이는 vector 대조군과 비교하여 통계적인 차이를 확인 할 수 없었으며(그림 9D, E), 50 mM NaCl에서 *CaPP2C* 형질전환체 담배의 생체량은  $0.053 \pm 0.003$  g이고 vector 대조군의 생체량이  $0.043 \pm 0.001$  g이므로 통계적인 차이를 확인 할 수 없었으며 뿌리 길이 역시 통계적인 차이가 없었다(그림 9F, G). 또한 100 mM NaCl, 200 mM NaCl의 조건에서 *CaPP2C* 형질전환체 담배는 vector 대조군과 비교하여 생체량과 뿌리 길이에 통계적인 차이가 없었으며 모든 식물체들이 전체적으로 노랗게 변하며 생장이 저해되는 것을 확인하였다(그림 9H-K). 결과적으로 *CaPP2C*을 과다발현시킨 형질전환체 담배는 모든 비생물 스트레스 조건에서 내성을 보이지 않는 것을 확인 할 수 있었다.

카나마이신을 포함하는 배지에서 선별된 *CaMAPK1* 형질전환체 담배들은 *CaMAPK1* 탐침DNA를 이용한 RNA blot 결과에서 모두 *CaMAPK1*를 대조군 식물체와 비교하여 과다발현 하고 있는 것이 확인 되어 이 형질전환체



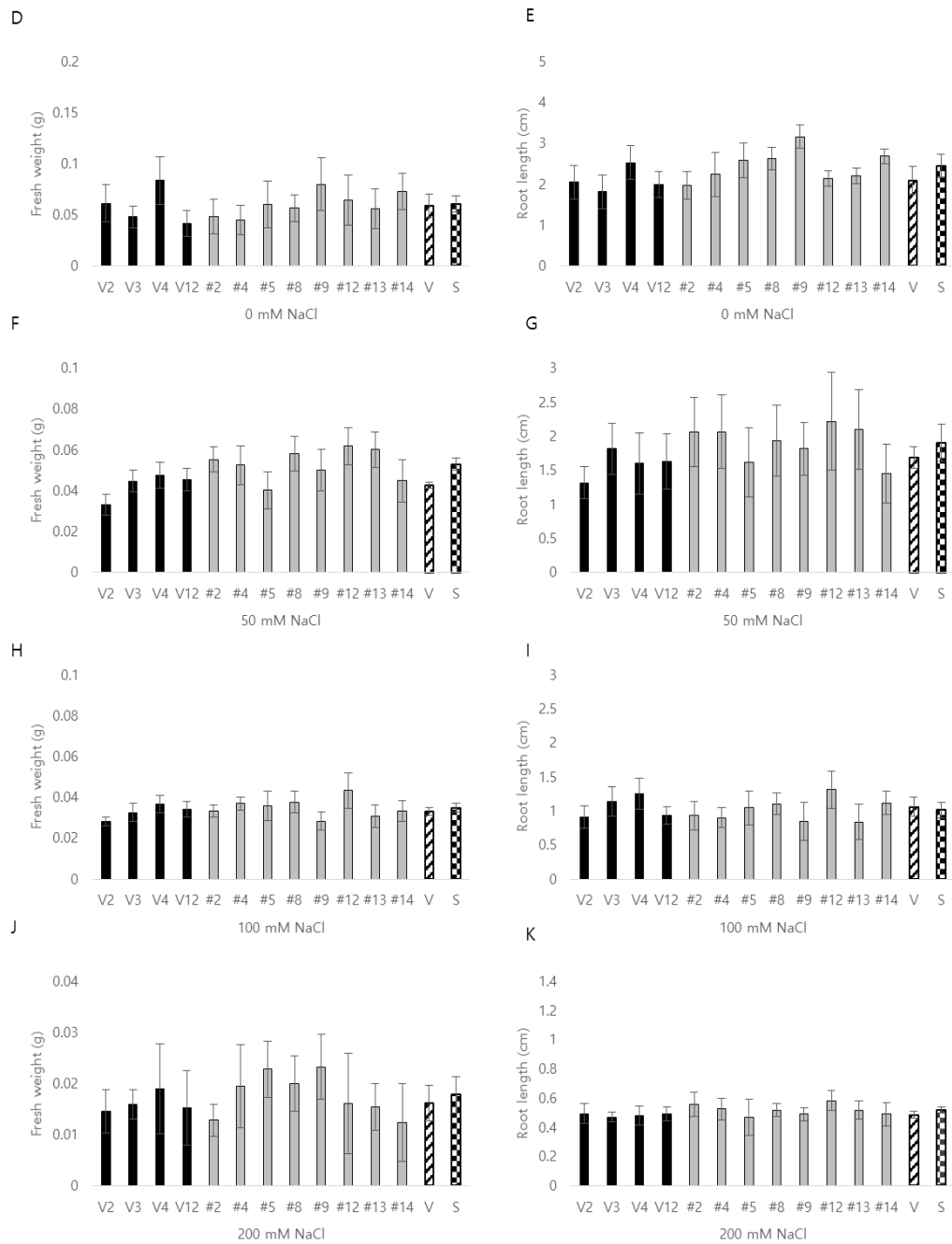


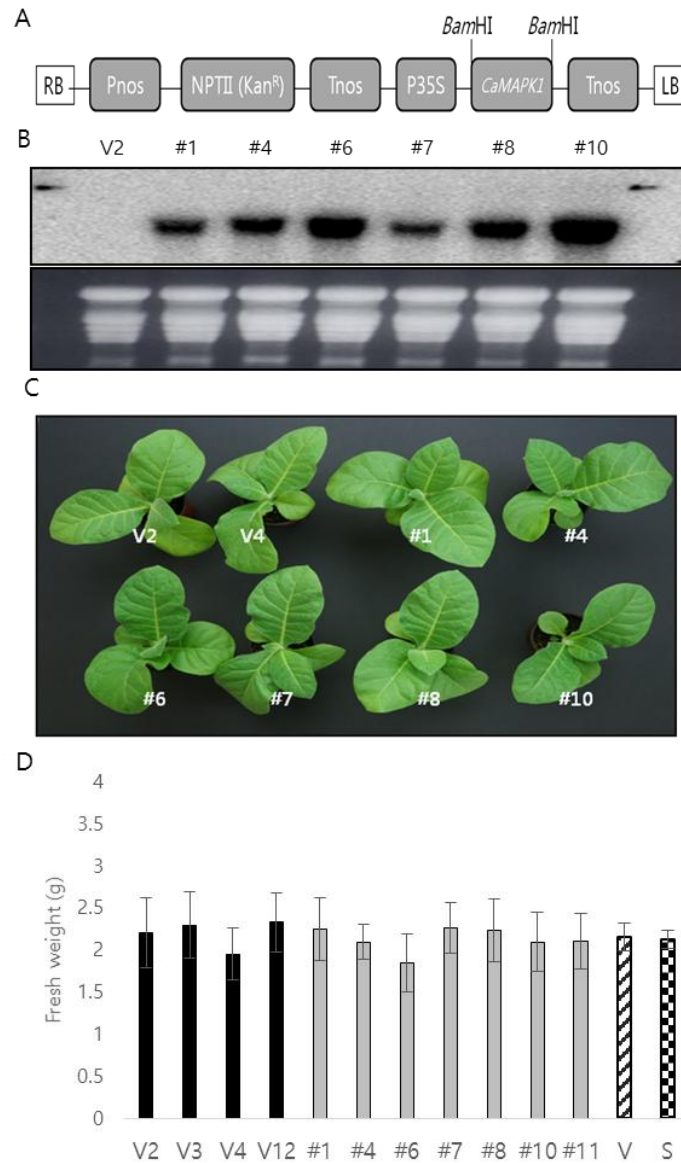
그림 9. *CaPP2C* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 비생물 스트레스조건에서의 생체량 비교 분석. A) 44 °C의 고온스트레스를 가한 후 일반생장 조건에서 이틀간 회복 후의 *CaPP2C* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체

량 비교 분석 결과이다. B) 25℃의 일반생장 조건에서 15일간 물공급을 중단  
 하여 건조스트레스를 가한 후 일반생장조건에서 물을 공급하여 이틀간 회복  
 후의 *CaPP2C* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량 비교 분석 결과이  
 다. C) 4℃의 저온스트레스를 가한 후 일반생장조건에서 이틀간 회복후의  
*CaPP2C* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량 비교 분석 결과이다. D)  
 고염스트레스 조건 중 0 mM NaCl에서 *CaPP2C* 형질전환체 담배와 vector  
 대조군의 생체량 비교 분석 결과이다. E) 고염스트레스 조건 중 0 mM NaCl  
 에서 *CaPP2C* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 뿌리 길이 비교 분석 결과  
 이다. F) 고염스트레스 조건 중 50 mM NaCl에서 *CaPP2C* 형질전환체 담배  
 와 vector 대조군의 생체량 비교 분석 결과이다. G) 고염스트레스 조건 중  
 50 mM NaCl에서 *CaPP2C* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 뿌리 길이  
 비교 분석 결과이다. H) 고염스트레스 조건 중 100 mM NaCl에서 *CaPP2C*  
 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량 비교 분석 결과이다. I) 고염스트  
 레스 조건 중 100 mM NaCl에서 *CaPP2C* 형질전환체 담배와 vector 대조군  
 의 뿌리 길이 비교 분석 결과이다. J) 고염스트레스 조건 중 200 mM NaCl에  
 서 *CaPP2C* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량 비교 분석 결과이다.  
 K) 고염스트레스 조건 중 200 mM NaCl에서 *CaPP2C* 형질전환체 담배와  
 vector 대조군의 뿌리 길이 비교 분석 결과이다. 고염 스트레스는 15일간 서  
 로 다른 농도의 NaCl을 포함한 MS 배지에서 배양된 식물체의 생체량 및 뿌  
 리길이가 측정되었다. 그래프 우측의 V는 vector 대조군 line들의 평균 생체  
 량 값 및 평균 뿌리 길이를 의미하며 S는 *CaPP2C* 형질전환체 담배 line들의  
 평균 생체량 값 및 평균 뿌리 길이를 의미한다. 오차막대는 95% 신뢰구간을  
 의미한다.



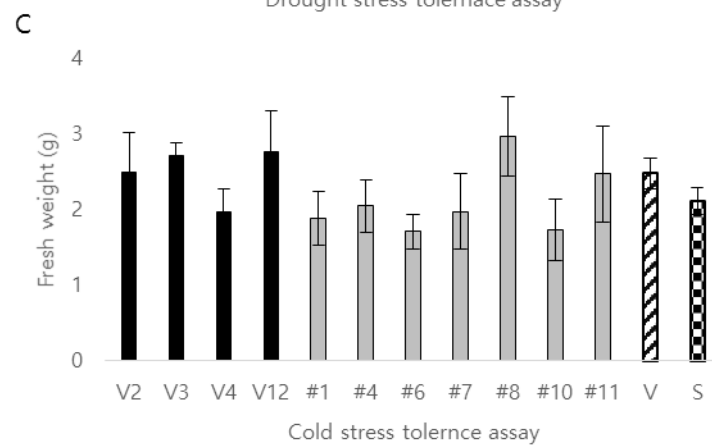
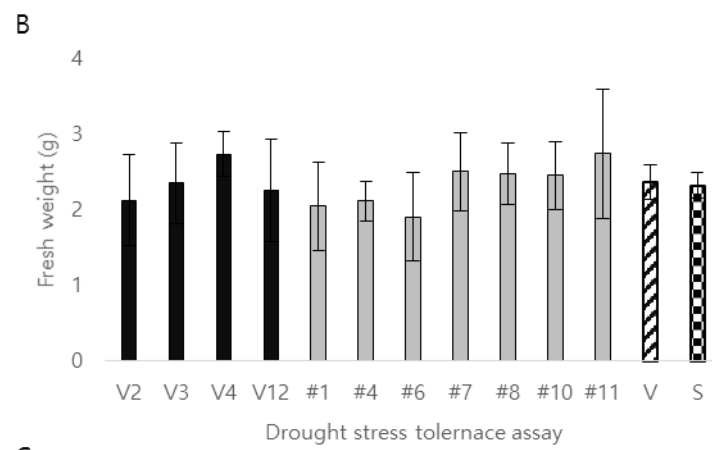
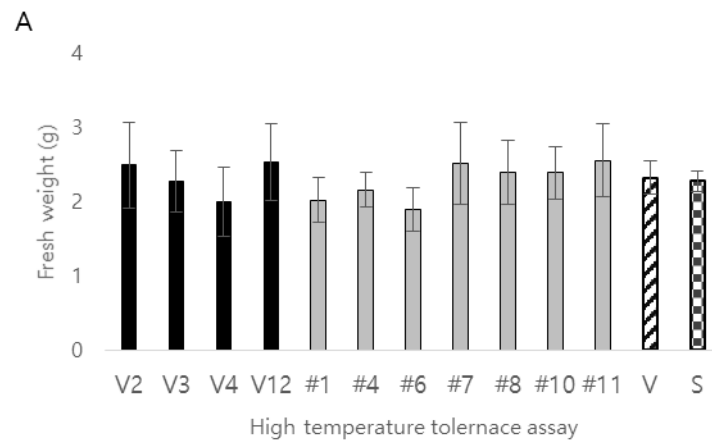
담배의 생체분석을 수행하였다(그림 10A-C). 그 결과 일반적인 생장 조건에서 3주간 생장한 *CaMAPK1* 형질전환체 담배의 생체량 비교결과에서, *CaMAPK1* 형질전환체 담배의 생체량은  $2.13 \pm 0.11$  g, vector 대조군은  $2.15 \pm 0.17$  g이 측정되어 *CaMAPK1* 형질전환체 담배의 생체량이 vector 대조군과 비교하여 통계적인 차이가 없었다(그림 10D). 고온 스트레스조건에서 *CaMAPK1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량은  $2.27 \pm 0.14$  g과  $2.32 \pm 0.22$  g이 측정되었고(그림 11A), 건조 스트레스 조건에서 *CaMAPK1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량은  $2.32 \pm 0.17$  g과  $2.37 \pm 0.23$  g이 측정되었다(그림 11B). 저온 스트레스 조건에서 생체량을 측정한 결과 *CaMAPK1* 형질전환체담배와 vector 대조군의 생체량은  $2.11 \pm 0.17$  g과  $2.48 \pm 0.20$  g이 측정되었다(그림 11C). 고염스트레스 조건중 0 mM NaCl에서 *CaMAPK1* 형질전환체 담배의 생체량은  $0.057 \pm 0.004$  g 이고 vector 대조군의 생체량이  $0.063 \pm 0.007$  g이며, 뿌리 길이는 *CaMAPK1* 형질전환체 담배가  $1.78 \pm 0.09$  cm이고 vector 대조군이  $2.54 \pm 0.35$  cm이다(그림 11D, E). 50 mM NaCl에서 *CaMAPK1* 형질전환체 담배의 생체량과 뿌리 길이는 각각  $0.038 \pm 0.003$  g,  $1.29 \pm 0.12$  cm이며 vector 대조군은  $0.037 \pm 0.004$  g,  $1.75 \pm 0.21$  cm이다(그림 11F, G). 100 mM NaCl에서 *CaMAPK1* 형질전환체 담배의 생체량과 뿌리 길이는 각각  $0.027 \pm 0.003$  g,  $0.94 \pm 0.14$  cm이며 vector 대조군은  $0.032 \pm 0.004$  g,  $1.03 \pm 0.06$  cm이므로(그림 11H, I), 결과적으로 *CaMAPK1*을 과다발현시킨 형질전환체 담배는 모든 비생물 스트레스 조건에서 내성을 보이지 않으며 오히려 저온 스트레스에는 취약하며 뿌리길이에 부정적인 영향을 주는 것을 확인 하였다.

카나마이신을 포함하는 배지에서 선별된 *CaBI-1* 형질전환체 담배들은



**그림 10.** *CaMAPK1*을 과다발현한 형질전환체 담배의 제작 및 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량 비교 분석. A) *CaMAPK1* 유전자를 식물체에서 과다발현시키기 위해 사용된 식물 발현 벡터 pBKS1-1/*CaMAPK1*의 유전자 지도이다. Pnos, nopaline synthase 유전자의 promoter; NPT, neomycin phosphotransferase 유전자; P35S, cauliflower mosaic virus

35S transcript의 promoter; Tnos, nopaline synthase 유전자의 terminator; Kan<sup>R</sup>, kanamycin resistance gene; RB, T-DNA right border; LB, T-DNA left border. B) T<sub>2</sub> 세대의 *CaMAPK1* 형질전환체 담배에서 *CaMAPK1*이 강하게 발현이 되는 것을 RNA blot 분석을 통해 확인하였다. RNA blot 분석 결과에는 실험에 사용된 식물체에서 추출한 20  $\mu$ g의 total RNA를 1.2% agarose gel에 전기영동하였으며 EtBr staining하였다. V는 vector 대조군을 의미하며 숫자는 *CaPP2C* 형질전환체 담배의 line 번호를 의미한다. C) *CaMAPK1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 형태학적 비교 결과이다. D) 일반생장 조건에서 약 20일간 배양한 *CaMAPK1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량 비교 분석 결과이다. 그래프 우측의 V는 vector 대조군 line들의 평균 생체량 값을 의미하며 S는 *CaMAPK1* 형질전환체 담배 line들의 평균 생체량 값을 의미한다. 오차막대는 95% 신뢰구간을 의미한다.



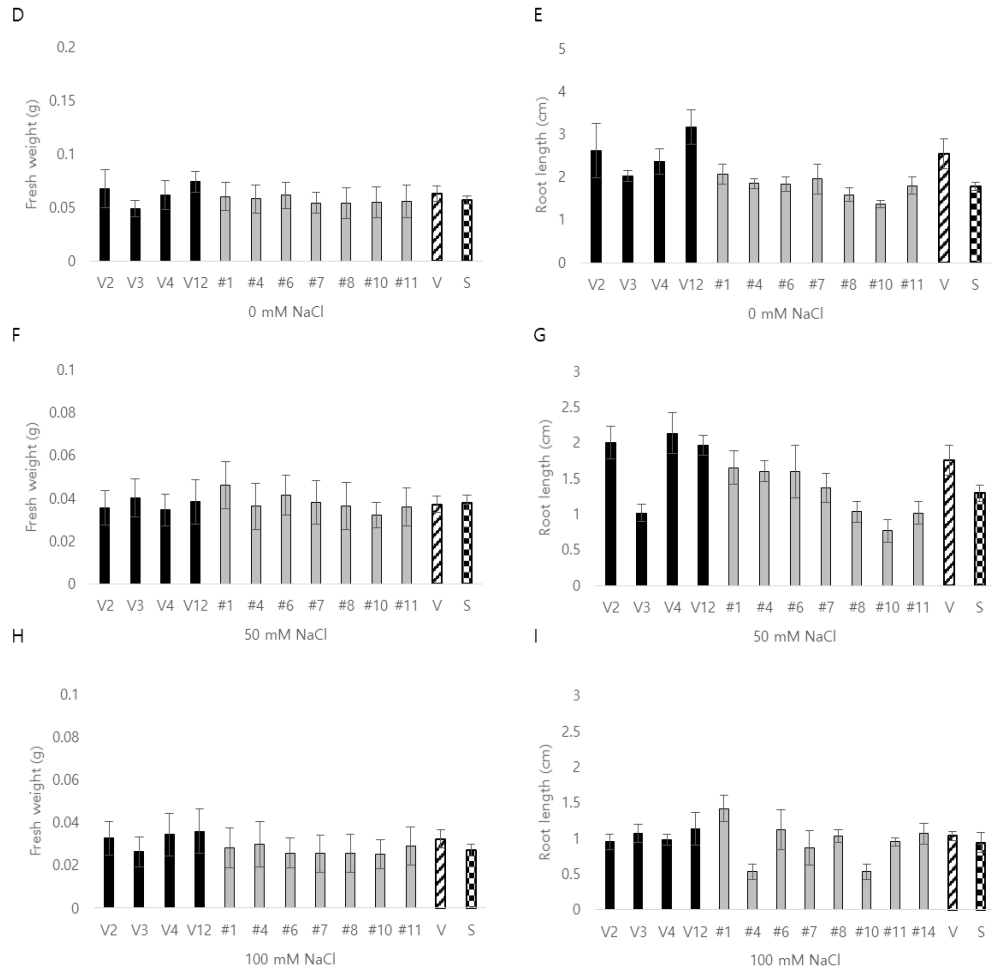


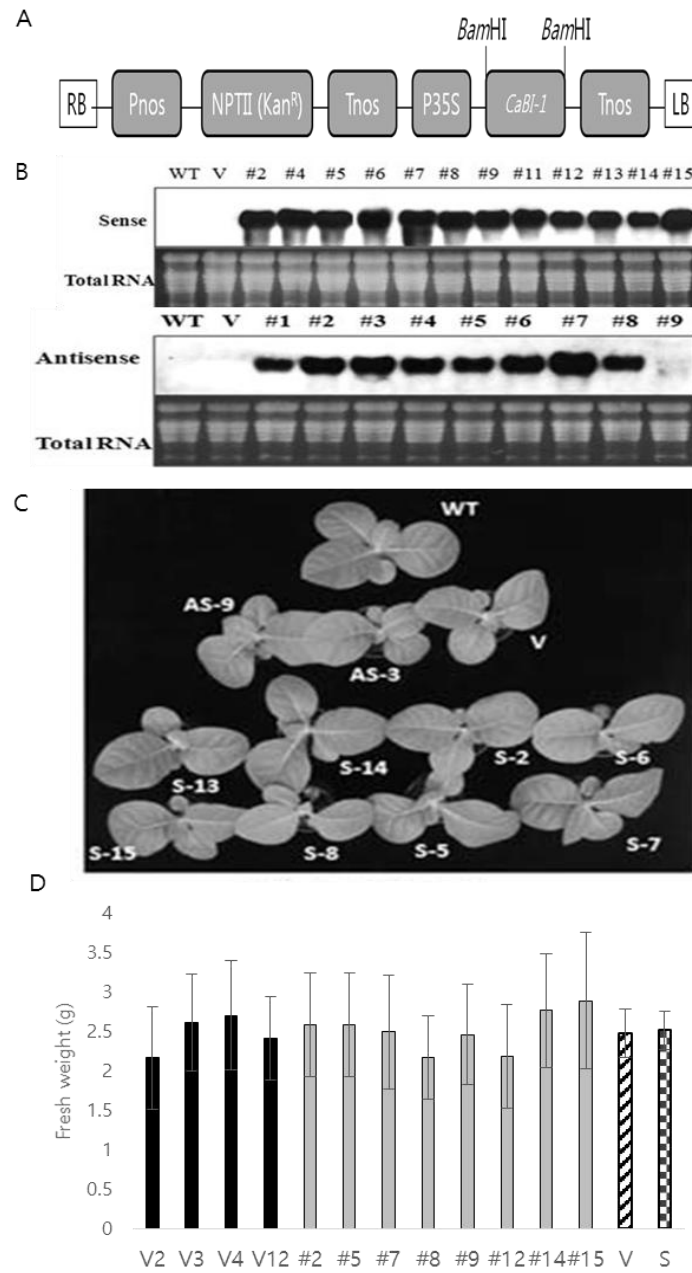
그림 11. *CaMAPK1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 비생물 스트레스조건에서의 생체량 비교 분석. A) 44℃의 고온스트레스를 가한 후 일반생장 조건에서 이틀간 회복 후의 *CaMAPK1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량 비교 분석 결과이다. B) 25℃의 일반생장 조건에서 15일간 물공급을 중단하여 건조스트레스를 가한 후 일반생장조건에서 물을 공급하여 이틀간 회복 후의 *CaMAPK1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량 비교 분석 결과이다. C) 4℃의 저온스트레스를 가한 후 일반생장조건에서 이틀간 회복

후의 *CaMAPK1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량 비교 분석 결과이다. D) 고염스트레스 조건 중 0 mM NaCl에서 *CaMAPK1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량 비교 분석 결과이다. E) 고염스트레스 조건 중 0 mM NaCl에서 *CaMAPK1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 뿌리 길이 비교 분석 결과이다. F) 고염스트레스 조건 중 50 mM NaCl에서 *CaMAPK1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량 비교 분석 결과이다. G) 고염스트레스 조건 중 50 mM NaCl에서 *CaMAPK1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 뿌리 길이 비교 분석 결과이다. H) 고염스트레스 조건 중 100 mM NaCl에서 *CaMAPK1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량 비교 분석 결과이다. I) 고염스트레스 조건 중 100 mM NaCl에서 *CaMAPK1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 뿌리 길이 비교 분석 결과이다. 고염 스트레스는 15일간 서로 다른 농도의 NaCl을 포함한 MS 배지에서 배양된 식물체의 생체량 및 뿌리길이가 측정되었다. 그래프 우측의 V는 vector 대조군 line들의 평균 생체량 값 및 평균 뿌리 길이를 의미하며 S는 *CaMAPK1* 형질전환체 담배 line들의 평균 생체량 값 및 평균 뿌리 길이를 의미한다. 오차막대는 95% 신뢰구간을 의미한다.

*CaBI-1* 탐침DNA를 이용한 RNA blot 결과에서 모두 *CaBI-1*를 대조군 식물체와 비교하여 과다발현 하고 있는 것이 확인 되어 형질전환체 담배의 생체 분석을 수행하였다(그림 12A-C). 일반적인 생육 조건에서 3주간 성장한 *CaBI-1* 형질전환체 담배의 생체량 분석결과, *CaBI-1* 형질전환체 담배는  $2.52 \pm 0.24$  g, vector 대조군은  $2.48 \pm 0.31$  g의 생체량이 측정되어 통계적인 차이가 없었다(그림 12D). 이러한 현상은 비생물 스트레스조건에서 수행된 생체분석 결과에서도 관찰되어 고온 스트레스조건에서 *CaBI-1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량은  $2.30 \pm 0.11$  g과  $2.27 \pm 0.17$  g이 측정되었고(그림 13A), 건조 스트레스 조건에서 *CaBI-1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량은  $2.40 \pm 0.15$  g과  $2.54 \pm 0.25$  g이 측정되었다(그림 13B). 저온 스트레스 조건에서 생체량을 측정한 결과, *CaBI-1* 형질전환체담배와 vector 대조군의 생체량은  $2.28 \pm 0.17$  g과  $2.09 \pm 0.21$  g이 측정되었다(그림 13C). 고염스트레스 조건중 0 mM NaCl에서 *CaBI-1* 형질전환체 담배의 생체량은  $0.080 \pm 0.009$  g이고 vector 대조군의 생체량이  $0.083 \pm 0.012$  g이고 뿌리 길이는 *CaBI-1* 형질전환체 담배가  $2.45 \pm 0.26$  cm이고 vector 대조군이  $2.35 \pm 0.31$  cm이다(그림 13D, E). 100 mM NaCl에서는 *CaBI-1* 형질전환체 담배와 vector 대조군 모두 심각하게 생장히 저하되어 통계적인 차이가 없었다(그림 13F, G). 결과적으로 *CaBI-1*을 과다발현한 형질전환체 담배는 고온, 건조, 저온, 고염스트레스에서 모두 내성을 보이지 않았다.

#### ***CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1*의 과다발현시 영향을 받는 ADP-ribosylation factor 유전자**

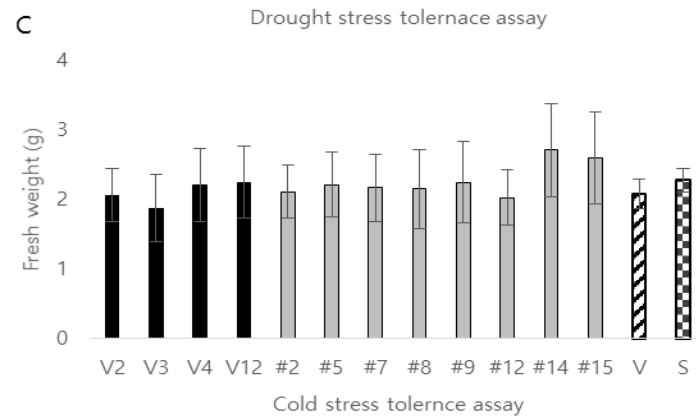
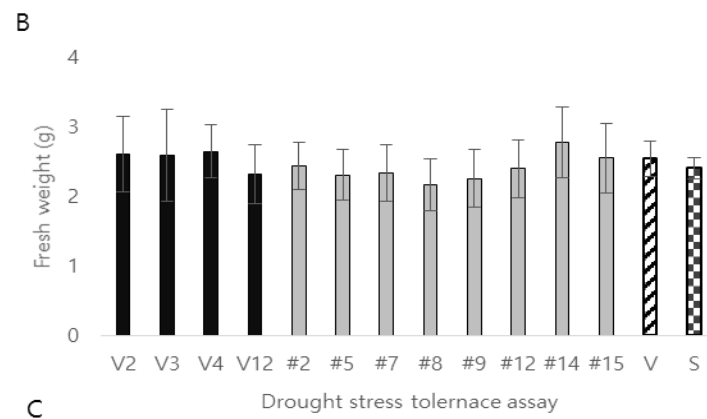
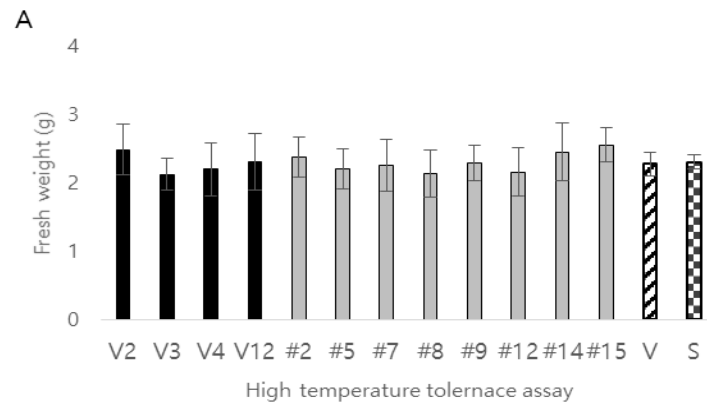
*CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1*은 비생물 스트레스에 의해 발현이

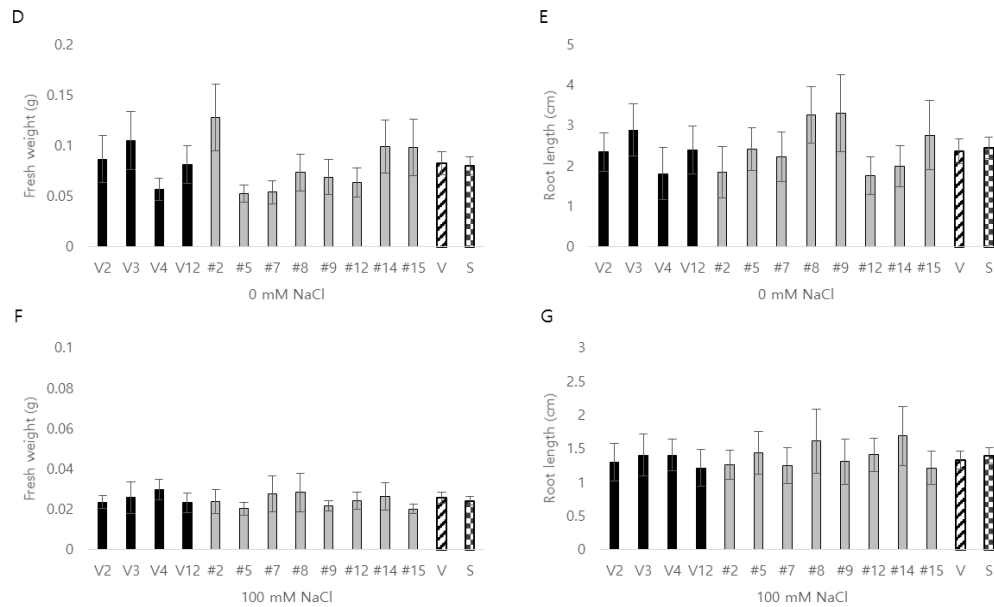


**그림 12.** *CaBI-1*을 과다발현한 형질전환체 담배의 제작 및 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량 비교 분석. A) *CaBI-1* 유전자를 식물체에서 과다발현시키기 위해 사용된 식물 발현 벡터 pBKS1-1/*CaBI-1*의 유전자 지



도이다. Pnos, nopaline synthase 유전자의 promoter; NPT, neomycin phosphotransferase 유전자; P35S, cauliflower mosaic virus 35S transcript의 promoter; Tnos, nopaline synthase 유전자의 terminator; Kan<sup>R</sup>, kanamycin resistance gene; RB, T-DNA right border; LB, T-DNA left border. B) T<sub>2</sub> 세대의 *CaBI-1* 형질전환체 담배에서 *CaBI-1*이 강하게 발현이 되는 것을 RNA blot 분석을 통해 확인하였다. RNA blot 분석 결과에는 실험에 사용된 식물체에서 추출한 20  $\mu$ g의 total RNA를 1.2% agarose gel에 전기영동하였으며 EtBr staining하였다. V는 vector 대조군을 의미하며 숫자는 *CaPP2C* 형질전환체 담배의 line 번호를 의미한다. C) *CaBI-1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 형태학적 비교 결과이다. D) 일반생장 조건에서 약 20일간 배양한 *CaBI-1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량 비교 분석 결과이다. 그래프 우측의 V는 vector 대조군 line들의 평균 생체량 값을 의미하며 S는 *CaBI-1* 형질전환체 담배 line들의 평균 생체량 값을 의미한다. 오차막대는 95% 신뢰구간을 의미한다.





**그림 13.** *CaBI-1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 비생물 스트레스조건에서의 생체량 비교 분석. A) 44℃의 고온스트레스를 가한 후 일반생장 조건에서 이틀간 회복 후의 *CaBI-1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량 비교 분석 결과이다. B) 25℃의 일반생장 조건에서 15일간 물공급을 중단하여 건조스트레스를 가한 후 일반생장조건에서 물을 공급하여 이틀간 회복 후의 *CaBI-1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량 비교 분석 결과이다. C) 4℃의 저온스트레스를 가한 후 일반생장조건에서 이틀간 회복후의 *CaBI-1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량 비교 분석 결과이다. D) 고염스트레스 조건 중 0 mM NaCl에서 *CaBI-1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량 비교 분석 결과이다. E) 고염스트레스 조건 중 0 mM NaCl에서 *CaBI-1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 뿌리 길이 비교 분석 결과이다. F) 고염스트레스 조건 중 100 mM NaCl에서 *CaBI-1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량 비교 분석 결과이다. G) 고염스트레스 조건 중 100 mM NaCl에서 *CaBI-1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 뿌리 길이 비교 분석 결과이다. 고염 스트레스는 15일간 서로 다른 농도의 NaCl을 포함한 MS 배지에서 배양된 식물체의 생체량 및 뿌리길이가 측정되었다. 그래프

우측의 V는 vector 대조군 line들의 평균 생체량 값 및 평균 뿌리 길이를 의미하며 S는 *CaBI-1* 형질전환체 담배 line들의 평균 생체량 값 및 평균 뿌리 길이를 의미한다.오차막대는 95% 신뢰구간을 의미한다.

유도되어 이 유전자들을 과다발현 시킨 형질전환체 담배는 비생물 스트레스에서 식물을 보호하는데 기능을 할 것이라 예상되었다. 하지만 3개의 유전자를 각각 과다발현 시킨 형질전환체 담배는 생체량 분석결과에서 vector 대조군과 비교하여 차이가 없었다. 그렇기 때문에 3개의 유전자의 과다발현이 3종의 형질전환식물체에 어떤 영향을 주는지 조사하기 위하여 3종의 형질전환식물체의 전사체 분석을 수행하였다. 전사체 분석을 통하여 vector 대조군과 각각의 형질전환체 담배의 유전자 발현의 차이를 비교한 결과 *CaPP2C* 형질전환체 담배에서 총 17개의 유전자가 vector 대조군 보다 높은 수준으로 상향 조절 된다는 사실을 확인 할 수 있었고(표 1) *CaMAPK1* 형질전환체 담배는 총 38개의 유전자가 vector 대조군 보다 높은 수준으로 상향조절 되었다(표 2). *CaBI-1* 형질전환체 담배는 총 51개의 유전자가 vector 대조군 보다 높은 수준으로 상향조절되었다(표 3). 각각의 전사체 분석결과에서 서로 다른 다양한 유전자들이 *CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1*의 하위 유전자로서 상향조절 되고 있었으며 분석결과중 유일하게 At1g70490인 ADP-ribosylation factor (ARF) 유전자만이 3종의 형질전환체 담배에서 공통적으로 높은 수준으로 상향 조절되는 것을 확인 할 수 있었다.

**표 1.** 전사체 분석을 통해 확인된 *CaPP2C* 형질전환체 담배에서 발현이 상향 조절되는 유전자 목록

AGI code	Gene description	Fold change
<b>Transcription factor</b>		
At5g37800	RHD SIX-LIKE 1 (RSL1)	34.7
At5g51230	Embryonic Flower 2 (emf2) identical to embryonic flower 2	9.7
<b>Metabolism</b>		
At1g66120	Acyl-activating enzyme 11 (aae11) similar to amp-binding protein	7.1
At1g60600	Encodes a protein similar to 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid phytyltransferase involved in phylloquinone and plastoquinone biosynthesis	13.3
At4g37670	N-acetyl-l-glutamate synthase 2 (NAGS2)	4.2
At4g37670	GCN5-related n-acetyltransferase(gnat) family protein	4.4
At5g53850	DEHYDRATASE-ENOLASE-PHOSPHATASE-COMPLEX 1 (DEP1)	28.6
At5g52030	TraB family protein	5.0
<b>Protein fate (folding, modification, destination)</b>		
At5g51250	Kelch repeat superfamily protein	12.9
At5g43010	26S proteasome AAA-ATPase subunit RPT4a (RPT4a)	5.4
At5g03030	Chaperone DnaJ-domain superfamily protein	5.8
At2g45135	RING/U-box superfamily protein	23.1
<b>Signal transduction</b>		
<b>At1g70490</b>	<b>ADP-ribosylation factor</b>	<b>22.0</b>
At4g23140	CYSTEINE-RICH RLK (RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE) 6 (CRK6)	4.0
At3g62290	A member of ARF GTPase family	39.8
<b>Protein synthesis</b>		
At3g53740	60s ribosomal protein 136 (rpl36b)	2.5
At3g42723	Aminoacyl-tRNA ligases	81.5

**표 2.** 전사체 분석을 통해 확인된 *CaMAPK1* 형질전환체 담배에서 발현이 상향조절되는 유전자 목록

AGI code	Gene description	Fold change
<b>Transcription factor</b>		
At2g40750	Member of WRKY Transcription Factor	3.0
At2g46790	Pseudo-response regulator PRR9	3.2
At3g45500	RING/U-box protein with C6HC-type zinc finger	9.0
<b>Signal transduction</b>		
<b>At1g70490</b>	<b>ADP-ribosylation factor</b>	<b>8.6</b>
At3g57680	Peptidase S41 family protein	3.4
At5g57610	Protein kinase superfamily protein with octicosapeptide/Phox/Bem1p domain	2.5
At3g62290	A member of ARF GTPase family	14.9
<b>Metabolism</b>		
At2g07687	Cytochrome c oxidase, subunit III	2.5
At1g76130	ALPHA-AMYLASE-LIKE 2 / 1,4-alpha-D-glucan glucanohydrolase	4.6
At1g32900	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein	3.3
At5g53850	DEHYDRATASE-ENOLASE-PHOSPHATASE-COMPLEX 1 (DEP1)	4.7
At1g12370	Encodes an amino acid sequence with significant homology to the recently characterized type II photolyases	4.0
At5g01410	Encodes a protein predicted to function in tandem with PDX2 to form glutamine amidotransferase complex with involved in vitamin B6 biosynthesis	3.4
At5g48730	Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein	3.5
At3g17930	Encodes a thylakoid membrane protein	10.0

At1g73650	Oxidoreductase activity, acting on the CH-CH group of donors	3.5
At2g32640	Encodes a lycopene beta cyclase that catalyzes the addition of beta-ionone end groups to the end of lycopene molecules	4.2
At1g17050	SOLANESYL DIPHOSPHATE SYNTHASE 2	8.0
At1g78510	SOLANESYL DIPHOSPHATE SYNTHASE 1	4.8
<b>Protein fate (folding, modification, destination)</b>		
At4g33110	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	2.7
At1g49780	Plant U-box 26 (PUB26)	3.4
At3g17480	F-box and associated interaction domains-containing protein	41.7
<b>Stress related protein</b>		
At1g69880	Thioredoxin H-type 8 (TH8)	2.8
At3g46970	ALPHA-GLUCAN PHOSPHORYLASE 2	3.0
At1g27730	Related to Cys2/His2-type zinc-finger proteins found in higher plants	3.5
At4g35090	Encodes a peroxisomal catalase	2.6
At1g66330	Senescence-associated family protein	3.0
<b>Transport facilitation</b>		
At5g02270	Member of NAP subfamily	4.1
At3g03180	Got1/Sft2-like vesicle transport protein family	6.1
<b>Unclassified protein</b>		
At1g19140	Expressed protein	5.3
At1g52855	Expressed protein	2.8
At2g23390	Expressed protein	2.6
At2g47485	Expressed protein	3.7
At3g30500	Expressed protein	3.2
At4g07690	Expressed protein	3.0



At5g16360	NC domain-containing protein-related	5.5
At5g49220	Expressed protein	2.9
At5g54870	Expressed protein	3.1

**표 3.** 전사체 분석을 통해 확인된 *CaBI-1* 형질전환체 담배에서 발현이 상향 조절되는 유전자목록

AGI code	Gene description	Fold change
<b>Protein fate (folding, modification, destination)</b>		
At3g12580	Heat shock protein 70	2.8
At5g02500	Heat shock protein 70 family	16.8
At3g09440	Heat shock protein 70 family	5.5
At3g47650	DnaJ/Hsp40 cysteine-rich domain superfamily protein	3.1
At4g13940	Encodes a S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	3.0
At2g37470	Histone superfamily protein	3.2
At3g27360	Histone superfamily protein	5.2
At5g10400	Histone superfamily protein	3.1
At3g52590	Ubiquitin extension protein 1	3.7
At4g05050	Ubiquitin 11	19.2
At5g35753	Heat shock protein, Hsp40	5.2
<b>Protein synthesis</b>		
At2g36170	60s ribosomal protein L40 A	4.8
At1g29070	Ribosomal protein L34	3.9
At2g20450	Ribosomal protein L14	6.3
At4g31985	Ribosomal protein L39 family protein	5.0
At3g53890	Ribosomal protein S21e	8.8
At3g53740	60s ribosomal protein 136 (rpl36b)	3.4
At3g47370	Ribosomal protein S10p/S20e family protein	7.3
At1g04480	Ribosomal protein L14p/L23e family protein	6.0
At3g05560	Ribosomal L22e protein family	4.7
At2g40205	Ribosomal protein L41 family	2.8
At2g36160	Ribosomal protein S11 family protein	2.8
At5g18380	Ribosomal protein S5 domain 2-like superfamily protein	3.8

<b>Metabolism</b>		
At4g38970	Fructose-bisphosphate aldolase 2	11.1
At1g54500	RBD1 is a thylakoid membrane-bound iron-binding protein	6.8
At5g38430	Encodes a member of the Rubisco small subunit (RBCS)	10.9
At5g10170	Myo-inositol-1-phosphate synthase 3	4.1
At1g61520	PSI type III chlorophyll a/b-binding protein	18.0
At1g31330	Photosystem I subunit F	4.1
At3g56940	Copper response defect 1	4.1
At3g54890	Photosystem I light harvesting complex gene 1	4.7
At1g29910	Chlorophyll a/b binding protein 3	7.7
At2g20260	Photosystem I subunit E-2	9.8
At1g78915	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	3.7
At3g11560	LETM1-like protein	5.3
At1g08380	Encodes subunit O of photosystem I	5.1
At1g64150	Photosynthesis affected mutant 71 (PAM71)	33.0
<b>Transport facilitation</b>		
At4g35100	A member of the plasma membrane intrinsic protein PIP	4.7
<b>Cell organization and biogenesis</b>		
At4g14960	Tubulin alpha-6 chain (tua6)	4.4
At3g18780	Actin 2 (act2)	5.7
At1g50010	Tubulin alpha-2 chain	6.4
<b>Signal transduction</b>		
At5g65430	14-3-3 protein G-box factor14 kappa	3.2
At5g45810	CBL-interacting protein kinase 19	3.9
At5g63870	Serine/threonine protein phosphatase 7	10.4
At1g70490	ADP-ribosylation factor	16.2
<b>Stress related protein</b>		
At4g19200	Proline-rich family protein	3.0
At5g35630	Glutamine synthetase 2	22.0
At5g08290	Yellow-leaf-specific gene 8	3.0

At5g17170	Enhancer of sos3-1	13.3
At4g21850	Methionine sulfoxide reductase B9	4.2
<b>Unclassified protein</b>		
At1g65295	Expressed protein	3.7

## 고찰

식물은 비생물 스트레스에 반응하는 과정에서 다양한 유전자의 조절들이 식물체내에서 이루어진다. 이 과정에서 식물은 직접적으로 식물 세포를 보호하기 위한 유전자들의 발현과 함께 조절 단백질의 발현을 유도한다. 조절 단백질에는 전사인자, 단백질 키나아제, 단백질 인산가수분해 효소등이 포함되고 이러한 조절 단백질의 생성으로 스트레스 반응에 대한 신호전달이 조절되어 다양한 하위유전자들의 발현이 조절된다(Singh and Laxmi, 2015; Wang et al., 2016). 기존에 보고된 연구결과들에서 ABA 신호전달을 조절하는 것으로 잘알려진 PP2C는 건조, 고염등의 비생물 스트레스에 의해 발현이 유도되며 PP2C가 기능을 하지 못하면 스트레스 내성 또한 감소하는 것으로 알려져 있다(Schweighofer and Meskiene, 2008; Wei and Pan, 2014; Singh et al., 2016). 본 연구에서, 고추에서 분리된 CaPP2C의 아미노산 서열을 애기장대의 PP2C의 아미노산 서열과 비교한 결과, 80개의 애기장대 PP2C는 크게 10개의 group으로 나뉘며 그중 CaPP2C는 Group D PP2C와 아미노산 서열이 가장 유사하였다. Group D PP2C는 다른 PP2C group과는 다르게 그 기능이 거의 알려져 있지 않았다. 식물에서 Group D PP2C는 대부분의 식물 조직에서 발현을 하는 것으로 알려져 있으며(Tovar-Mendez et al., 2014) 원형질막의  $H^+$ -ATPase의 활성을 조절하는 기능을 갖는 것으로 알려져 있다(Spartz et al., 2014). 스트레스 신호를 세포내로 전달하는 중요한 신호전달 구성요소인 MAPK 또한 다양한 스트레스에 의해 발현이 유도되고 애기장대, 벼의 MAPK 유전자의 과다발현은 건조, 고염 스트레스등에 대한 내성증가로 이어졌다(Hoang et al., 2012; Xu and Chua, 2012; Moustafa et al., 2014). 본 연구에서 고추에서 분리된 CaMAPK1 역시 다른 종의 MAPK의 아미노산 서열 비교결과에서 CaMAPK1과 다른 종의 MAPK

의 아미노산 서열과의 유사성을 확인 할 수 있었으며 특히 같은 가지과 식물인 *S. lycopersicum*의 MAPK와 비교하여 유사성이 높은 것을 확인 할 수 있었다. BI-1은 병원체 및 비생물 스트레스에 발현이 유도되며 세포사멸을 억제하는 기능을 갖고 있는 것으로 알려져 있어 비생물 스트레스와의 연관성을 보여주었다(Watanabe and Lam, 2009). 때문에 본 연구에서 고추에서 분리된 *CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1* 역시 다양한 비생물 스트레스에서 강하게 발현이 유도되므로, 식물 내에서 이 유전자들이 비생물 스트레스에서 기능을 가질 것이라 예상하여 이들의 기능을 확인 하였다. 그 결과 3개의 유전자를 각각 과다발현 시킨 형질전환체 담배는 고온, 건조, 저온, 고염스트레스에서 모두 내성을 보이지 않았으며, 일반생장조건에서도 vector 대조군과 비교하여 형태적 차이가 없고 생체량 비교 결과에서 통계적인 차이를 찾아 볼 수 없었다. 오히려 *CaMAPK1* 형질전환체 담배는 뿌리의 길이가 vector 대조군과 비교하여 더 짧아지는 현상이 확인 되었고, 저온 스트레스조건에서는 생체량의 감소가 측정되어 *CaMAPK1*의 과다발현에 의한 부정적인 영향을 확인하였다.

비생물 스트레스에서 강하게 발현이 유도되는 3개의 유전자들을 담배 식물체에 과다발현시킨 결과는 기존 보고된 연구 결과와는 다르게 비생물 스트레스에 내성을 보이지 않았다. 이러한 현상은 *CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1* 이외에 비생물 스트레스에 대응하기 위해 필요한 또 다른 유전자의 발현 및 조절이 3종의 형질전환 식물체에서 원활히 이루어 지지 않아 발생된 것으로 예상된다. 앞서 설명된 애기장대와 벼의 MAPK 유전자의 과다발현은 건조, 고염등의 스트레스에서 식물체의 내성을 증가 시켰다. 하지만 MAPK 유전자의 과다발현이 항상 식물체의 내성 증가에 긍정적인 결과를 이끄는 것은 아니다. 예를들어, 애기장대와 벼의 또다른 MAPK인 *MKK9*,

*OsMAPK33*의 과다발현은 고염스트레스에 대해 취약했고 *MKK9*의 발현 억제에는 오히려 고염스트레스에 대한 내성의 증가로 이어졌다(Alzwy and Morris, 2007; Lee et al., 2011). 또한 애기장대의 *MAPKKK20*의 돌연변이 식물체 또한 고염스트레스에 대한 내성이 증가하므로(Gao and Xiang, 2008) MAPK cascade에 포함된 유전자들의 과다발현이 항상 식물체에 긍정적인 영향을 주는 것이 아니며 부정적 영향을 주는 경우도 확인되었다. 이러한 현상은 MAPK 이외에도 확인되었다. 식물의 비생물 스트레스 내성 증가에 영향을 주는 것으로 알려진 전사인자는 다양한 스트레스 조건에서 발현이 유도되며 이들의 과다발현은 식물체 내성의 증가로 이어졌다(Wang et al., 2016). 하지만 몇몇 전사인자의 과다발현은 때로는 형질전환 식물체의 왜소화나 개화시기를 늦추게 하고(Lippold et al., 2009; Wang et al., 2016) 동일한 유전자가 서로 다른 식물종에서 다른 표현형을 보이는 경우가 발생하므로, 그 이유는 식물이 비생물 스트레스에 반응하는 과정이 매우 복잡하기 때문에, MAPK 또는 전사인자 같이 하나의 조절 단백질을 변화시키는 것 뿐만 아니라, 이 조절 단백질과 함께 조절되는 상위 혹은 하위 조절 단백질들이 함께 변화되어야 되는 것으로 예상된다. 즉 다양한 조절 단백질의 활성을 조절하는 신호전달이 식물의 비생물 스트레스 반응에 중요할 것이라 예상된다. 그러므로 본 연구에서 비생물 스트레스에 직접적으로 발현이 유도되는 3개의 유전자는 복잡한 신호전달체계를 갖고 있는 식물에서 3개 유전자들과 함께 조절되어야 될 다른 상위 혹은 하위 유전자들의 기능이 식물체 내에서 기능을 갖지 못하여 비생물 스트레스에서 식물의 내성증가에 영향을 주지 못한 것이라 추측된다. 그렇기 때문에 이들 3종의 형질전환 담배의 전사체 분석을 통해 3개의 유전자가 각각의 형질전환 식물체내에서 서로 상당히 다른 유전자들을 상향조절 하지만, 그 중에 ARF 유전자가 3종의 형질전환체 담배에서

공통적으로 상향 조절된다는 사실을 확인 할 수 있었다. 그러므로 비생물 스트레스조건에서 발현이 강하게 유도되는 3개의 유전자들에 의해 ARF 유전자가 상향조절 되므로 비생물 스트레스조건에서 기능을 가질 것이라 예상하였다.



## 2장. *NtARF1* 유전자의 식물생장 및 비생물 스트레스와의 연관 관계

### 서론

ADP ribosylation factors (ARFs)는 small GTP binding protein으로서 Ras superfamily에 속한다(D' Souza-Schorey and Chavrier, 2006). ARF는 다양한 진핵생물에서 잘 보존 되어 있으며, 포유류에서 ARF의 분류는 그들의 아미노산 서열에 따라 크게 ARF와 ARL (ADP-ribosylation factor-like protein) 이 두 그룹으로 나뉘며 각각 6개의 ARF와 14개의 ARL이 존재한다. 6개의 ARF는 다시 3개의 클래스로 나뉘게 된다(Vernoud et al., 2003; Yorimitsu et al., 2014). Class 1에는 Arf1, Arf2, Arf3가 포함되고 Class 2에는 Arf4와 Arf5가 포함된다. Class 3에는 Arf6가 포함되며, Class 1 과 Class 3에 포함되는 ARF의 연구가 가장 잘 이루어져 있다. Class 1의 ARF는 vesicle trafficking을 조절하고 Class 3에 해당하는 Arf6는 내포작용과 actin cytoskeleton remodeling을 조절하는 것으로 알려져 있으며, ARL은 상대적으로 그 기능이 잘 알려져 있지 않다(Donaldson and Jackson, 2011). 21kD의 작은 크기를 갖고 있는 ARF는 N-말단에 미리스토일화되어 세포막과 연계하여 작용을 하는 것으로 알려져 있다. ARF의 기능은 GTP 결합 활성화 상태와 GDP 결합 비활성화 상태를 오가며 조절되는데(Moss and Vaughan 1998; Lee et al., 2005), GEF (guanine nucleotide exchange factor)에 의하여 ARF는 GDP와 GTP의 교환이 이루어지게 되고 GTP 결합 활성화 상태의 ARF는 cargo

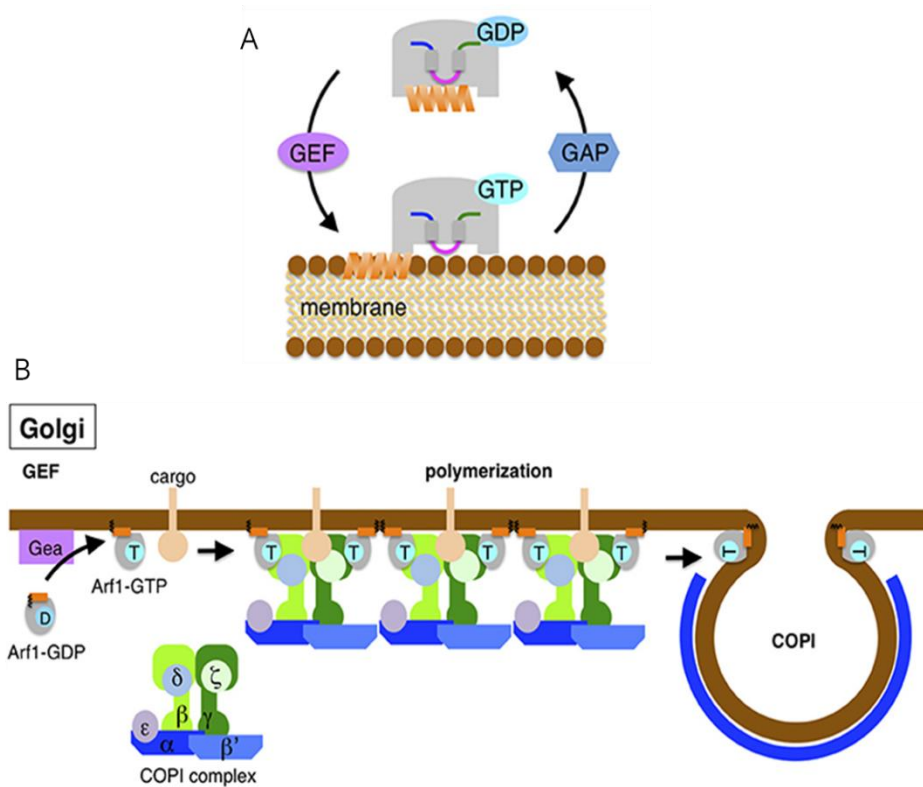


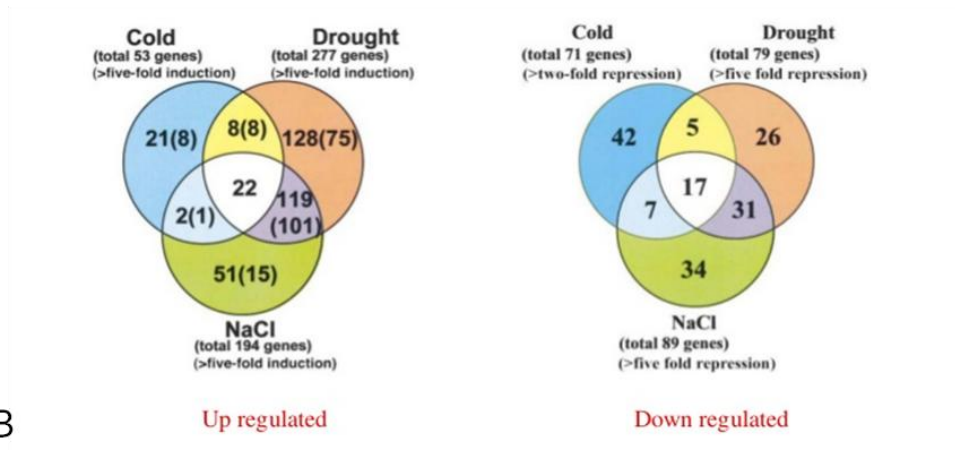
그림 14. Small GTPase ARF porotein. A) ARF의 기능은 GTP-bound form과 GDP-bound form을 오가며 조절된다. GEF와 GAP는 이들의 기능을 조절한다. B) Coat protein인 COPI complex와의 결합은 vesicle을 형성한다. GTP-bound 상태의 활성 ARF는 골지체의 막에 결합하여 세포질의 COPI complex를 recruit한다. Recruit된 COPI complex에 의해 vesicle이 형성된다(Yorimitsu et al., 2014).

분자의 vesicle trafficking을 위해 세포질에서 외피단백질을 recruit하여 COPI 복합체와 결합하고(그림 14), COPI 복합체이외에 clathrin adaptor protein 복합체 또는 lipid-modifying enzyme인 phospholipase D (PLD), phosphatidylinositol 4-kinase등의 effector 단백질들과 결합하여 기능을 하는 것으로 알려져 있다(Shin and Nakayama, 2004; Nakai et al., 2013). GTP와 결합된 ARF는 GAP (GTPase activating protein)에 의해 GTP의 가수분해가 이루어져 ARF-GDP형태로 전환되어 막에서 떨어져 나오게 된다. ARF의 effector protein인 PLD는 ARF에 의해 활성화되고 활성화된 PLD는 plasma membrane에서 지질 이중층막을 형성하는 phosphatidyl choline (PC)를 hydrolysis하여 phosphatidic acid (PA)를 생성한다. PA는 vesicle을 형성하는데 필요한 분자들을 recruit하며 외피 단백질에 의하여 vesicle이 형성되어 endocytosis가 이루어 지게 된다(Liscovitch et al., 2000). ARF는 여러 식물에서 존재하며 epidermal cell polarity, cell proliferation, endocytosis등을 ARF가 조절 하는 것으로 알려져 있다(Gebbie et al., 2005; Xu and Scheres, 2005; Naramoto et al., 2010). ARF는 root hair로 발달되는 trichoblast에서 기능을 하는 것으로 알려져 있다. ARF는 root hair forming cell에 위치하지만 atrichoblast cell에서는 ARF가 존재하지 않았다. ARF의 기능이 억제된 식물은 root hair tip 형성이 억제되는 것이 확인 되어 ARF가 cell polarity에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Xu and Scheres, 2005). 또한 애기장대 ARF 유전자인 *AtARF*를 억제시킨 식물은 vesicle trafficking에 의해 조절되는 세포분열, 세포팽창, 셀룰로오스의 형성이 억제되어 식물의 생장이 확연히 저해되었고, 옥수수 ARF 유전자인 *ZmARF1*과 *ZmARF2*를 애기장대에 각각 과다발현 시킨 형질전환식물체의 잎과 종자크기가 증가하여 ARF가 식물의 성장과

발달에 관여 한다는 것을 확인 할 수 있다(Gebbie et al., 2005; Yuan et al., 2013; Wang et al., 2016). 기존의 식물에서의 연구들은 대부분 ARF의 생리화학적 기능에 대한 연구가 되어 왔다. 최근 벼의 몇몇 ARF 유전자가 비생물 스트레스에서 발현이 유도된다는 결과가 보고 되었지만(Muthamilarasan et al., 2016) 아직 까지 ARF와 비생물 스트레스와의 연관성에 대한 연구가 거의 이루어 지지 않았다.

비생물 스트레스에 의해 다양한 유전자들의 발현이 유도되지만, 각각의 스트레스마다 발현이 유도되는 유전자가 서로 다르기 때문에 식물의 비생물 스트레스에 대한 반응은 매우 복잡하게 얽혀있다. 식물에 서로 다른 비생물 스트레스를 가한 결과에서, 식물은 스트레스에 따라 발현이 유도되는 유전자가 대부분 차이를 보이는 것이 확인 되었다(Seki et al., 2002; Li et al., 2017). 애기장대의 microarray 분석 결과에서 각각의 서로 다른 비생물 스트레스에 의하여 발현이 유도되는 유전자를 분석한 결과, 대부분의 상향 또는 하향 조절되는 유전자들은 각각의 스트레스에 특이적으로 발현이 유도되지만 이중 공통적으로 건조, 저온, 고염 스트레스에서 발현이 유도되는 유전자들 또한 존재하였다(그림 15A). 이러한 현상은 또다른 식물체의 스트레스 발현 유도 유전자들을 분석한 결과에서 역시 확인 되어, 수천개의 서로 다른 유전자들이 발현이 되는 중에 전사인자등의 비생물 스트레스에 기능을 갖는 소수의 유전자들이 모든 스트레스 조건에서 공통적으로 발현이 유도되었다(그림 15B). 이 결과는 서로 다른 스트레스조건 이지만, 식물이 스트레스에 대한 저항을 위해서는 고온, 건조, 저온, 고염등의 각기 다른 스트레스에 의해 활성화된 신호전달에서 특정 신호전달 구성요소를 서로 공유하여 “cross talk”에 의해 공통적으로 발현이 필요한 유전자들을 신호전달이 조절하는 것으로 보여진다(Chinnusamy et al., 2004; Ni et al.,

A



B

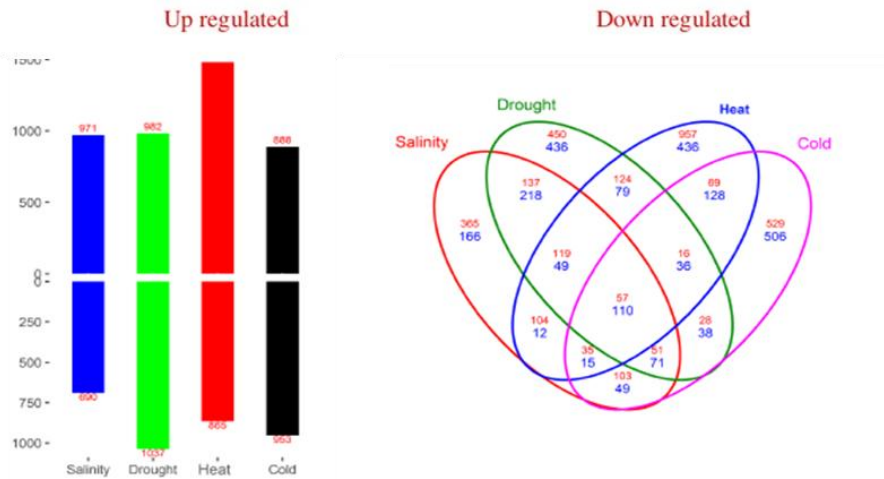


그림 15. 다양한 비생물 스트레스에 의해 발현이 유도되는 유전자들의 분석.

A) Microarray 분석을 통해 확인된 애기장대에서 저온, 건조, 고염의 스트레스에 의해 발현이 유도되는 유전자들의 분류. B) RNA sequencing을 통해 옥수수에서 고온, 저온, 건조, 고염 스트레스에 의해 발현이 유도되는 유전자들의 분류(Seki et al., 2002; Li et al., 2017).

2009; Zhang and Sonnewald, 2017). 본 연구에서 다양한 비생물 스트레스에서 발현이 유도되는 유전자인 *CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1*을 과다발현 시킨 3종의 형질전환 식물체에서 ARF 유전자가 공통적으로 높은 수준으로 발현이 상향조절되는 것이 확인되었다. 그러므로 ARF가 기존에 알려진 그들의 생리학적 기능 이외에 비생물 스트레스 유도성 유전자들의 하위 유전자로서 식물체 내에서 다른 기능을 가질 것이라 예상하여, 담배에서 ARF 유전자를 분리하고 식물체 내에서 ARF의 기능에 대해 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 식물 재료 및 고온스트레스 처리

담배 식물체는 25°C로 유지되며 60%의 상대습도와 16시간 광주기를 갖는 생장실에서 배양하였다. RNA 추출에는 5주간 배양된 식물들이 사용되었다. 고온스트레스 처리를 위하여 담배 식물체를 44°C로 유지되며 90%의 상대 습도를 갖는 배양기에서 4시간 동안 고온스트레스를 가하였다. 대조군은 일반적인 배양 조건에서 동일한 기간 배양하였다.

### RNA blot 분석

담배에서 total RNA의 추출에 대해 간단히 설명하면, 각 조직을 액체질소와 함께 막자 사발에서 분쇄한 뒤 3 ml의 extraction buffer (100 mM LiCl, 100 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM EDTA, and 1% SDS)을 첨가하여 잘 섞어준다. 여기에 3 ml의 chloroform-isoamyl alcohol (24:1)를 첨가하여 vortex후 4°C의 10,000 × g 속도로 25분간 원심분리한 뒤 현탁액을 새로운 튜브에 옮겨 담는다. 새로운 튜브에 옮겨 담은 현탁액과 동일한 양의 chloroform-isoamyl alcohol (24:1)를 첨가한 뒤 위의 원심분리과정을 반복한다. 원심분리 후 현탁액을 새로운 튜브에 옮겨 담고 여기에 동일한 양의 4 M LiCl를 첨가하여 섞어준 후 -70°C에 3시간 보관한다. 이후 원심분리 후에 튜브에 생성된 pellet을 70% 에탄올로 세척한 뒤 DEPC를 처리한 증류수에 용해시킨다. 이렇게 준비된 20 µg의 전체 RNA를 포름알데히드가 포함된 1.2% agarose gel에 전기영동시킨 뒤 이 전기영동 된 gel을 nylon membrane(GE Healthcare Life Sciences)에

blotting한다. *NtARF1*에 특이적인 탐침 DNA 생성을 위하여 두 개의 primer (5′ -ATGGGGCTGACATTCACCAAG-3′ , 5′ -TTAGGCCTTGTTAGCGATGTTG-3′)는 *NtARF1*의 cDNA 염기서열을 기초로 제작되었다. 위의 primer를 사용해 PCR 증폭된 *NtARF1*의 DNA는  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP로 표지되어 혼성화에 사용되었다. Blotting된 membrane은 1시간에서 2시간 동안 예비 혼성화를 거친 뒤 65°C에서 16시간 동안 혼성화시켰으며 혼성화에 사용된 용액은 1 M dibasic sodium phosphate (pH 7.2), 14% (w/v) SDS, 0.5 M EDTA (pH 8.0)를 포함하고 있다. 혼성화 후에 nylon membrane의 세척은 65°C에서 0.2X SSC와 0.1% SDS를 포함한 용액을 사용하였다. 이후에 nylon membrane은 phosphor imaging screen (BAS Storage Phosphor Screens; GE Healthcare Life sciences)에 노출시켜 혼성화 결과를 얻게 되었다.

#### cDNA library의 제작 및 screening

*CaPP2C* 형질전환 식물체에서 추출된 poly (A) RNA는 Uni- $\lambda$  ZAP XR vector cDNA synthesis kit (Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA)을 이용한 cDNA library 제작에 사용되었다. cDNA library 제작에 대해 간단하게 설명하면 *XhoI* adapter를 포함한 첫 번째 cDNA 가닥의 생성은 priming oligo(dT)<sub>18</sub>에 의해 이루어진다. 두 번째 cDNA 가닥의 생성 후 cDNA 말단은 *EcoRI* adapter에 의해 blunted되었다. 이렇게 생성된 cDNA들은 *XhoI*을 처리한 뒤 Uni- $\lambda$  ZAP XR vector arm에 ligation되어 Gigapack II Gold packaging extract (Agilent Technology)에 packaging되었다. 생성된 cDNA library는  $1.4 \times 10^6$  pfu ml<sup>-1</sup>의 titer를 갖고 있었으며 cDNA library는 *Escherichia coli* strain XL1-Blue에 의해



lawn이 형성된 LB-agar plate위에 도말하여 plaque가 형성되었다. Plaque가 형성된 각각의 plate에 nylon membrane을 이용하여 duplication을 시킨 뒤 duplication된 nylon membrane을 1.5 M NaCl/0.5 M NaOH으로 변성시키고 1.5 M NaCl/0.5 M Tris-HCl pH 7.3으로 중화시킨 후  $2\times$  SSC/0.2 M Tris-Cl pH 7.5으로 세척하여 UV를 조사하여 고정시켰다. 혼성화 반응을 위한 탐침DNA는, 애기장대의 ARF 유전자의(At1g70490) 염기서열을 기초로 제작된 primer들과(그림 17A, TAIR10) *CaPP2C* 형질전환체 담배에서 추출한 poly (A)를 활용한 cDNA로 RT-PCR을 수행해 증폭된 PCR 산물을  $^{32}\text{P}$ 로 표지한뒤, 담배의 ARF cDNA clone들을 선별하기 위한 cDNA library screening의 탐침자로 활용하였다. 앞선 RNA blot에서 설명된 방식과 동일하게 혼성화 후 nylon membrane은  $2\times$  SSC, 0.1% (w/v) SDS로 30분간 세척 후 intensifying screen과 함께  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 X-ray film에 감광시켰다(Sambrook and Russell, 2001). 이렇게 선별한 담배의 cDNA clone을 *NtARF*라 명명하였다.

## DNA 염기서열의 분석과 비교

cDNA clone의 염기서열은 automated DNA sequencer (Applied Biosystems)을 통해 분석되었다. Multiple sequence alignment는 Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)에 의해 수행되었으며 염기서열 및 아미노산 서열의 비교분석에는 National Center for Biotechnology Information platform (NCBI)의 BLAST 및 BLASTP가 이용되었다.

## Genomic DNA blot 분석

Genomic DNA의 추출은 Richards et al. (2001)의 CTAB방법을 활용하였다. 담배의 잎을 액체질소와 함께 분쇄한 후 미리 가열된 CTAB 용액[1.4 M NaCl, 2% (w/v) hexadecyl trimethyl ammonium bromide, 0.5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0]을 첨가한 뒤 65°C에서 30분간 반응시킨다. 그리고 20  $\mu$ l 0.1 mg ml<sup>-1</sup> RNase A를 첨가한 뒤 37°C에서 15분간 반응시킨다. 여기에 동일한 양의 chloroform:isoamyl alcohol (24:1)를 첨가하여 섞은 뒤에 13,000  $\times$  g의 속도로 15분간 원심분리 한다. 원심분리 후 현탁액을 새로운 튜브에 옮긴 뒤 동일한 양의 chloroform:isoamyl alcohol (24:1)를 첨가하여 섞은 뒤에 13,000  $\times$  g의 속도로 15분간 원심분리 한다. 원심분리 후, 0.8배의 isopropanol을 현탁액에 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시켜 genomic DNA의 침전을 기다린다. 이후 10,000  $\times$  g의 속도로 10분간 원심분리하여 생성된 pellet을 70% 에탄올로 세척한 뒤 pellet을 TE 용액(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 녹인다. Genomic DNA-blot 분석은 Sambrook et al. (2001)방식에 따라 진행하였다. 20  $\mu$ g의 genomic DNA를 각각 *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Xba*I로 처리한 뒤 0.6% agarose gel에 전기영동 시켰다. 전기영동된 agarose gel은 1.5 M NaCl/ 0.5 M NaOH 용액에서 30 분간 변성시켰고 1.5 M NaCl/ 1 M Tris-HCl, pH 8.0 용액으로 30분간 중화 시킨뒤 Hybond N+ membrane (GE Healthcare Life Sciences)에 blotting 하였다. 탐침자 제작과 혼성화 반응에 대한 설명은 앞선 RNA-blot분석에 설명되어 있으며 혼성화 후 세척이 완료된 nylon membrane은 phosphor-imaging screen (GE Healthcare Life Sciences)에 노출 시켰다.

### *NtARF1*을 과다발현 시킨 형질전환체 담배 제작

*NtARF1*의 ORF는 담배의 cDNA clone과 *Bam*HI 제한효소 서열을 포함한 두 개의 primer를 (5' - ATATGGATCCATGGGGCTGACATTCACCA-3' , 5' - ATATGGATCCCTTAGGCCTTGTTAGCGATGTTG-3' , 밑줄은 *Bam*HI 제한효소 서열) 이용하여 PCR을 통해 증폭하였다. PCR조건의 처음 시작은 95°C에서 5 분간 주형 가닥을 변성시켰으며 이후 30 cycle을 95°C에서 30초간, 58° C에서 30초간 72° C에서 1분간 반응 시키고 마지막에 72°C에서 5분간 반응시켰다. PCR을 통해 증폭된 *NtARF1* DNA는 *Bam*HI을 처리 후에 pBKS1-1 식물 발현벡터(Suh et al., 1994)의 CaMV 35S 프로모터 뒤에 위치하는 *Bam*HI site에 ligation 시켰다. Cloning후의 염기서열은 automated DNA sequencer (Applied Biosystems)에 의해 확인 하였으며 *NtARF1*의 ORF가 sense방향, anti-sense 방향으로 각각 삽입된 두 개의 pBKS1-1- *NtARF1* 재조합 DNA는 *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404에 각각 형질전환 시켰다(Horsch et al., 1985). 형질전환된 각각의 *Agrobacterium* cell을 1-2 cm로 자른 멸균된 담배 잎의 절편에 감염시켰다. 24시간 동안 공동배양을 한 뒤 담배잎의 절편을 200 mg/ml 카나마이신과 100 mg/ml cefotaxime 을 포함한 shoot 유도 배지에서 배양하였다. 배양과정에서 카나마이신에 저항성을 갖는 shoot만을 선별하여 200 mg/ml 카나마이신을 포함하는 뿌리 유도 배지에 옮겨 배양을 시작하였다. 여기서 선별된 형질전환 식물체로 추정되는 형질전환체 담배는 다시 토양으로 옮겨져 일반적인 생장환경에서 배양 후 자가수정을 통해 종자를 수확하였다.

## *NtARF1*에 특이적인 역전사 PCR 분석

담배의 ARF clone들의 ORF는 염기서열의 유사성이 높기 때문에 *NtARF1*의 발현을 식물체내에서 확인 하기 위하여 reverse transcription (RT)-PCR이 사용되었다. RT-PCR 분석을 위해서 *NtARF1*을 위한 특이성이 높은 primer들이 제작되었다. 이 primer들은 *NtARF*의 3' untranslated region (UTR)에서 디자인되어(그림 17A, 표 4) primer의 특이성은 DNA-blot을 통해 확인하였다(그림 19). 간단히 설명하자면, 9개의 *NtARF* clone의 plasmid DNA를 *EcoRI* 과 *XhoI*으로 제한효소 처리한 뒤 0.7% agarose gel에서 전기영동한다. 이후 nylon membrane으로 전기영동된 agarose gel을 blotting하고  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP으로 5' 말단을 표식한 *NtARF1* primer과 함께 혼성화시켰다. Blotting과 혼성화 반응조건은 앞서 설명한 genomic DNA-blot방식과 동일하게 수행됐다. *NtARF1*의 발현 양을 *CaPP2C* 형질전환 식물체와 고온스트레스를 처리한 담배에서 확인 하기 위하여 각각의 식물체에서 추출한 total RNA를 37°C에서 DNase I (Takara, Kusatsu, Japan)으로 처리하였고 phenol-chloroform extraction을 통해 DNase I를 제거하였다. cDNA의 합성에는 AMV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하였고 42°C에서 1시간 반응하여 생성된 cDNA는 Nano Drop spectrophotometer (ND-1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)으로 cDNA의 양을 확인한 뒤 동일한 양의 cDNA, 3' UTR에서 design한 *NtARF* primer, PCR mix (EmeraldAmp GT PCR Master Mix, Takara)와 함께 PCR을 수행하였고 PCR의 처음 시작은 95°C에서 5 분간 주형 가닥을 변성시켰으며 이후 30 cycle을 95°C에서 30초간, 58°C에서

30초간 72°C에서 1분간 반응 시키고 마지막에 72°C에서 5분간 반응시켰다.

전사체 분석결과에서 상향조절된 유전자들의 발현양상을 *CaPP2C* 형질전환체 담배와 *NtARF1* 형질전환체 담배에서 각각 확인하기 위하여 *NtARF1* 형질전환체 담배에서 추출된 total RNA는 앞서 설명된 *CaPP2C* 형질전환체 담배의 total RNA와 동일한 방식으로 cDNA를 합성하였으며 RT-PCR 분석에 사용된 primer의 서열은 표 5에 기술되어 있으며 각각의 primer들은 *Arabidopsis* 27K Oligo Microarray chip (GreenGene Biotech, Korea)에 올라와있는 oligonucleotide 염기서열을 기초로 design 하였으며 각 유전자에 특이적인 primer를 활용하여 RT-PCR을 수행하였고 RT-PCR을 수행한 방식은 위의 설명과 동일하게 이루어졌다.

#### 일반생장 조건 및 비생물 스트레스에서의 생체량분석

*NtARF1* 형질전환체 담배 그리고 vector 대조군은 1장의 “재료 및 방법”에 기술된 조건과 동일한 환경에서 배양 하여 일반 생장조건에서의 식물체의 생체량 분석 및 고온, 건조, 저온, 고염스트레스에서의 생체량 분석에 사용 되었다.

#### 종자 발아 분석

*NtARF1* 형질전환 식물체의 종자의 발아 비율을 확인 하기 위하여 T<sub>2</sub> 세대의 *NtARF1* 형질전환 식물체와 vector 대조군 식물체의 종자가 사용되었다. 25°C의 암조건에서 Whatman’ s filter paper 위에 모든 식물체의 종자를 위치하여 24시간 동안 배양한다. 24시간의 imbibition 후 16시간의 광주기를 갖는 조건에서 48시간 동안 배양을 하여 종자의

발아비율을 확인한다. 이와 함께 ARF의 활성을 억제하는 것으로 알려진 brefeldin A (BFA) (Renault et al., 2003)를 이용한 ARF의 기능을 확인하기 위한 실험에서 4  $\mu$ m BFA, 8  $\mu$ m BFA, 12  $\mu$ m BFA, or 16  $\mu$ m BFA를 포함하는 Whatman' s filter paper #1위에 모든 식물체의 종자를 위치하여 앞선 조건과 동일하게 종자의 발아 비율을 확인하였다. 모든 종자는 작은 뿌리(radical)가 형성되었을 때 발아한 것으로 판단하여 한 식물체의 line당 50개의 종자가 사용되었고 두 번의 반복실험이 진행되었다.

## 결과

### 담배에서 ARF 유전자 분리 및 특성 분석

담배에서 ARF 유전자를 분리하기 위하여 cDNA library를 제작하였으며, 이 cDNA library의 제작에는 *CaPP2C* 형질전환체 담배에서 추출한 poly (A) RNA가 사용되었다. 담배 ARF 분리를 위한 cDNA library screening에 사용된 탐침DNA는, 애기장대의 ARF 유전자의 (At1g70490) 염기서열을 기초로 제작된 primer쌍과(그림17A, TAIR10), *CaPP2C* 형질전환체 담배에서 추출한 poly (A) RNA를 이용하여, RT-PCR을 통해 증폭된 PCR 결과물을  $^{32}\text{P}$ 로 표지하여 담배의 ARF cDNA clone들을 선별하기 위한 cDNA library screening의 탐침DNA로 활용하였다. cDNA library screening의 결과에서 80,000개의 plaque중에서 ARF cDNA로 추정되는 150개의 clone을 확보하였으며, 150개 clone중 9개의 clone의 염기서열은, NCBI database를 활용하여 기존의 다른 식물 종에서 보고된 ARF 유전자와 비교를 통해 유사성이 높은 것이 확인되었으며 전체 ORF를 포함하므로 최종적으로 9개의 담배 ARF (*NtARF*) 유전자를 선별하였다(그림 16, 그림17A).

선별한 9개의 *NtARF* clone들의 염기서열과 애기장대의 ARF 유전자의 염기서열을 함께 multiple sequence alignment하였으며 그 결과 선별한 9개의 *NtARF* 유전자들은 높은 유사성을 갖고 있으며, 특히 ORF가 상당히 유사성이 높았다. 하지만 ORF와 비교하여 각각의 5' UTR과 3' UTR은 비교적 서로간의 유사성이 떨어져 차이가 있다는 것을 확인 할 수 있었다(그림 17A). 선별된 9개의 *NtARF*의 아미노산 서열은 서로 98%이상의 유사성을 보여주므로 차이가 거의 없는 것을 확인 할 수 있었다(그림 17B). 그리고 9개의 *NtARF*는 모두 GTP-binding motif에 의해 구성된 4개의 domain과

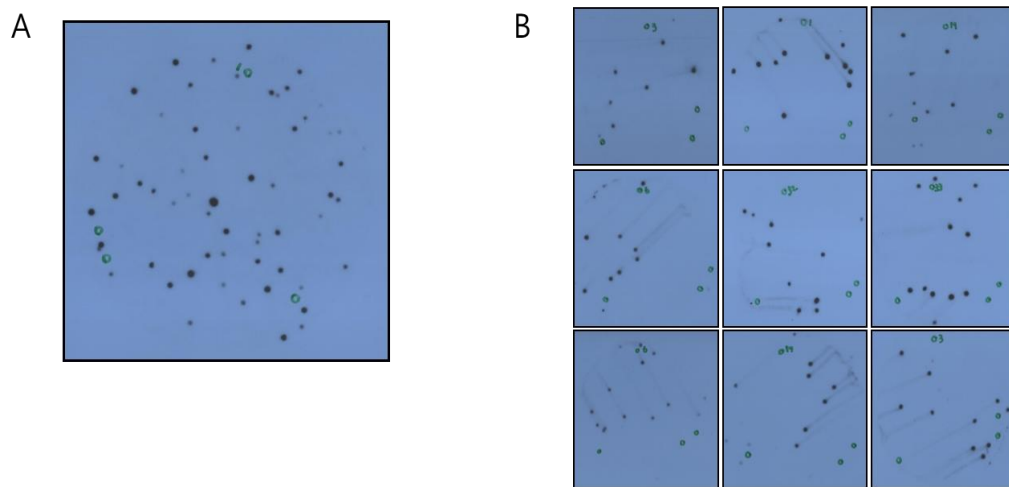
GEF Sec7 domain인 2개의 switch region, 1개의 GAP interaction domain인 effector region을 모두 갖고 있었으며 N-말단의 두번째 Gly에 미리스토일화 site가 존재하였으며 이를 토대로 NtARF는 다른 식물에서와 마찬가지로 높은 수준으로 담배 내에서 보존되어 있다는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 9개의 *NtARF* 중 *NtARF1*, *NtARF3*, *NtARF9*은 동일한 단백질을 coding하였고 *NtARF4*와 *NtARF6*도 동일한 단백질을 coding하였으며 *NtARF5*와 *NtARF7*도 동일한 단백질을 coding하였다. *NtARF2*와 *NtARF8*은 서로 다른 단백질을 coding하였으므로 결과적으로 9개의 *NtARF* clone은 5개의 서로 다른 NtARF 단백질을 coding하는 것을 확인 하였다.

담배에서 추출한 genomic DNA는 4개의 서로 다른 제한 효소로 처리 하였으며 genomic DNA blot분석 결과에서 다수의 밴드가 나타나는 것을 확인할 수 있었다(그림 18). 이 결과를 통하여 담배에 여러 ARF gene family가 존재한다는 것을 확인하였다.

### ***CaPP2C* 형질전환 식물체와 고온스트레스조건에서 *NtARF1*의 발현분석**

담배에서 분리한 9개의 *NtARF* 중 *NtARF1*의 염기서열은 cDNA library screening에 사용한 탐침 DNA의 염기서열과 유사성이 가장 높아 *NtARF1*이 *CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1* 형질전환체 담배에서 공통적으로 발현이 상향조절되는 ARF 유전자일 것이라 추정하였다. 때문에 *NtARF1*이 전사체분석 결과에서와 같이 높은 수준으로 상향조절되는지 확인하기 위하여, *NtARF1*의 발현 양상을 *CaPP2C* 형질전환체 담배에서 확인하고자 *NtARF1*에 특이적인 primer 쌍을 제작하였다. 선별한 9개의 *NtARF*는 cDNA의 염기서열의 유사성이 매우 높기 때문에 특이성이 높은 primer쌍을 활용하여 NtARF1 유전자의 발현을 확인하였다. 각각의 primer쌍은 *NtARF* clone들





**그림 16.** 담배 ARF 유전자를 분리하기 위한 cDNA library screening. A) 담배 ARF cDNA clone을 분리하기 위해 *CaPP2C* 형질전환체 담배에서 추출한 poly (A) RNA를 이용하여 제작한 cDNA library의 first screening 결과. B) First screening결과에서 positive 결과를 보인 plaque들의 second screening 결과.

[illegible]

B

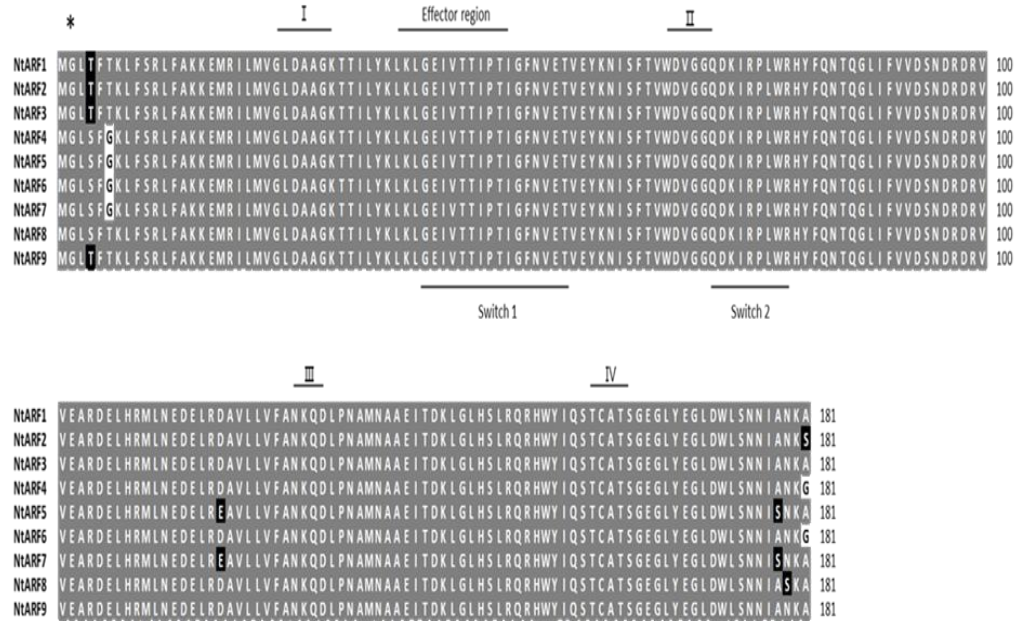


그림 17. 담배에서 분리한 ARF cDNA clone들의 cDNA 염기서열 및 아미노산 서열의 다중 서열 정렬 결과. A) 9개의 NtARF clone의 염기서열을 애기장대 ARF 유전자중에 하나인 At1g70490과 다중 서열 정렬한 결과이다. 붉은색 밑줄은 cDNA library screening에 사용된 탐침 DNA를 준비하는데 사용한 primer들의 서열을 표시하였으며 푸른색 점선은 *NtARF1*에 특이적인 RT-PCR 분석에 사용된 primer들의 서열을 표시하였다. B) 9개의 NtARF의 아미노산 서열을 분석한 결과 myristoylation site는 star로 표시하였고 GTP-binding motif에 의해 구성된 4개의 domain (I-IV), 두 개의 GEF Sec7 interaction domain (switch 1 and 2), 한 개의 GAP interaction domain (effector region)은 선으로 표시하였다. 밝거나 짙은 색의 서열은 partially conserved residue를 의미한다.

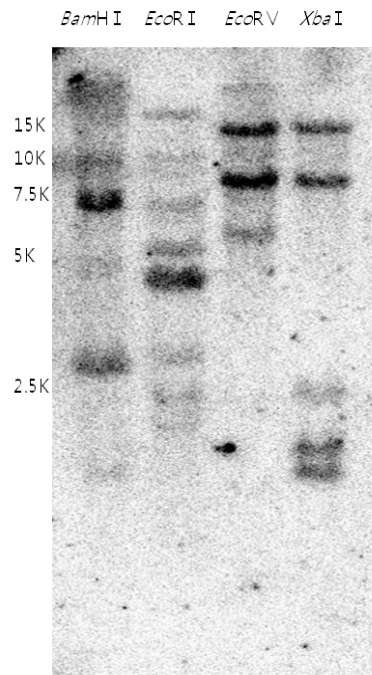


그림 18. NtARF 유전자에 대한 genomic DNA blot 분석결과. 담배의 genomic DNA는 *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Xba*I로 각각 처리하였고 혼성화에는 NtARF1 cDNA의 ORF를  $^{32}$ P로 표지하여 탐침 DNA로 사용하였다. DNA의 크기는 왼쪽에 킬로베이스로 표시하였다.

의 3'UTR에서 design 되어 각각의 *NtARF* clone들에 특이적으로 결합한다. 9개의 *NtARF*의 plasmid DNA를 *EcoRI* 과 *XhoI*으로 처리하여 준비한 DNA blot 결과에서, *NtARF1*의 primer 쌍은 *NtARF1* clone에만 특이적으로 결합하는 것을 확인 할 수 있었다(그림 19). 위에 특이성이 확인된 primer 쌍을 사용하여 *CaPP2C* 형질전환체 담배에서 *NtARF1*의 발현양을 확인한 결과에서 *NtARF1*은 vector 대조군 보다 *CaPP2C* 형질전환체 담배에서 발현이 높게 된다는 사실을 확인할 수 있었고(그림 20) 이를 통해 *NtARF1*이 우리가 목표로 하는 3종의 형질전환체 담배에서 공통적으로 발현이 높게 조절되는 ARF 유전자라는 것을 확인 하였다.

또한 *NtARF1*은 고온스트레스에서 발현이 유도되는 것이 확인되었다(그림 21). 담배에 44℃의 고온 스트레스를 가한 후 *NtARF1*의 전사물의 발현이 유도되는지 확인한 RT-PCR 결과에서, 대조군과 비교하여 *NtARF1* 전사물이 고온스트레스를 준 30분 후에 약한 발현이 유도되며 고온스트레스를 준 후 3시간 까지 그 발현 양이 유도되며, 이후에는 발현이 유도되지 않는 것을 확인 하였다(그림 21B). 동일한 고온 스트레스조건에서, 다른 NtARF 유전자와 유사성이 높은 *NtARF1*의 ORF를 탐침DNA로 사용한 RNA blot결과는, 고온스트레스 후 대조군과 비교하여 전체 NtARF 유전자의 전사물이 빠르게 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(그림 21A). 그러므로 이 결과를 통해 담배에 고온스트레스를 주었을 때 *NtARF1*이 고온스트레스에 의해서 발현이 유도 되는 것을 확인 할 수 있었다.

표 4. RT-PCR 분석을 위한 *NtARF*들의 primer 서열

Name	Sequence (5'- 3')
<i>NtARF1</i> -F	TGATGCAGATTTGTTAT
<i>NtARF1</i> -R	GGAGATGTTTCATAACCA
<i>NtARF3</i> -F	ACCAACGTAGAGTTG
<i>NtARF3</i> -R	AAGGGATATTCATAACCA
<i>NtARF4</i> -F	GTTGAACGCGAGATC
<i>NtARF4</i> -R	TCTCGCGAAAGAAAG

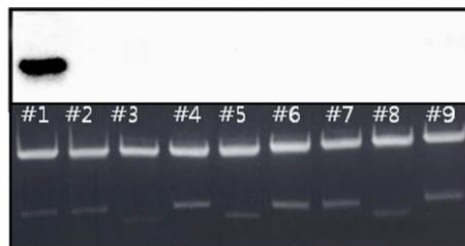


그림 19. *NtARF1* primer의 특이성 확인을 위한 DNA-blot 분석결과. 3' UTR에서 design된 *NtARF1*의 primer들은 그림 17A에 표시하였다. 9개의 *NtARF* cDNA clone들은 *Eco*RI 과 *Xho*I으로 처리한 뒤 전기영동을 통해 cDNA insert와 pBluescriptII SK- vector로 나뉘었고 이 agarose gel을 blotting하여  $^{32}$ P로 표지 된 *NtARF1* primer를 탐침DNA로 활용하여 혼성화 시켰다.

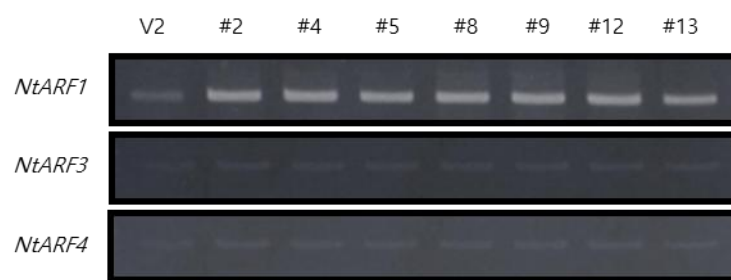
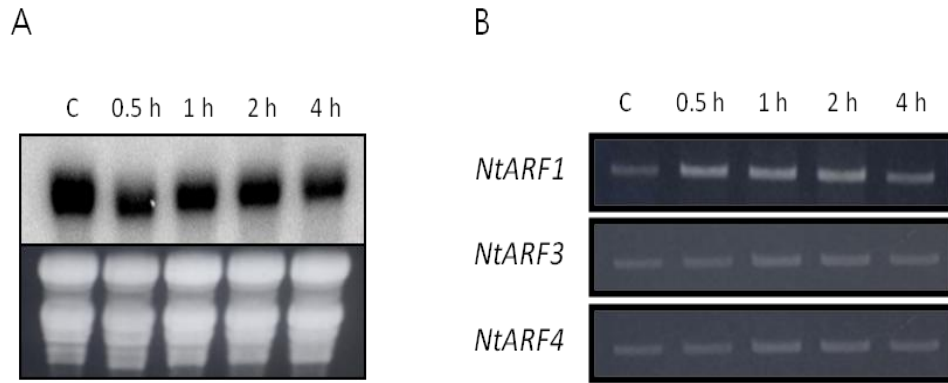


그림 20. *CaPP2C* 형질전환체 담배에서의 RT-PCR을 통해 분석된 NtARF 유전자의 발현결과. *CaPP2C* 형질전환체 담배에서 특이성이 확인된 *NtARF1* primer(그림 19)를 이용한 RT-PCR 결과에서 vector 대조군과 비교하여 *CaPP2C*가 과다발현된 형질전환 식물체의 line들에서 *NtARF1*의 발현이 높게 이루어지고 있다.



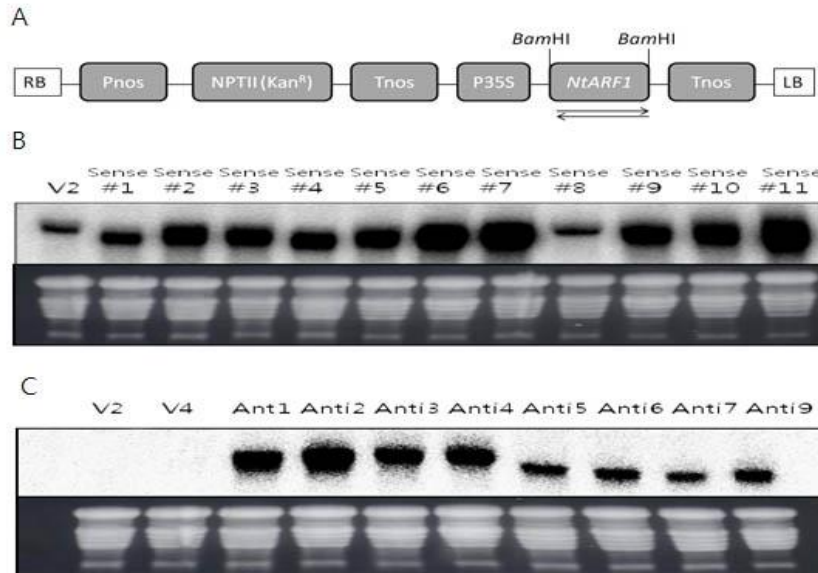


**그림 21.** 고온스트레스조건에서 *NtARF* 유전자의 발현분석. A) 고온스트레스에서 *NtARF*들의 전사체 발현이 유도되는지 확인한 RNA blot 결과이다. *NtARF* cDNA clone들의 ORF 염기서열은 매우 유사성이 높기 때문에 *NtARF1*의 ORF를  $^{32}\text{P}$ 로 표지한 탐침자를 사용한 RNA blot결과는 일반적인 생장조건인 대조군에서 많은 *NtARF* 전사체들의 발현이 유도되는 것이 확인되었다. 44℃의 고온스트레스를 가한 조건에서 *NtARF* 전사체들은 빠른 속도로 감소하는 것이 확인되었다. RNA blot 분석 결과에는 실험에 사용된 식물체에서 추출한 20  $\mu\text{g}$ 의 total RNA를 1.2% agarose gel에 전기영동하였으며 EtBr staining하였다. B) 고온스트레스 조건에서 *NtARF1*이 특이적으로 발현이 유도되었다. DNA blot으로 *NtARF1*에 대한 특이성이 확인된 primer를 사용한 RT-PCR 결과에서 *NtARF1*은 대조군과 비교하여 고온스트레스처리 30분 후부터 발현이 유도되어 2시간까지 발현이 지속적으로 유도되었고 고온스트레스를 가한 4시간째에는 *NtARF1*의 발현이 감소된 것을 확인 할 수 있다. 본 실험에서 44℃의 고온스트레스를 담배에 총 4시간 가하였으며 C는 고온스트레스를 처리하지 않은 대조군을 의미한다.



## *NtARF1* 과다발현을 통한 형질전환체 담배 제작

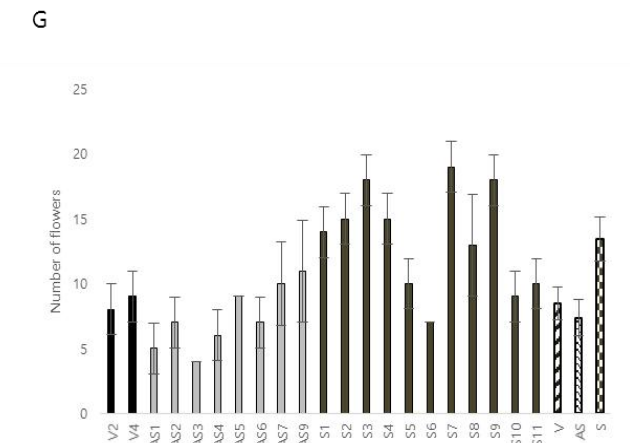
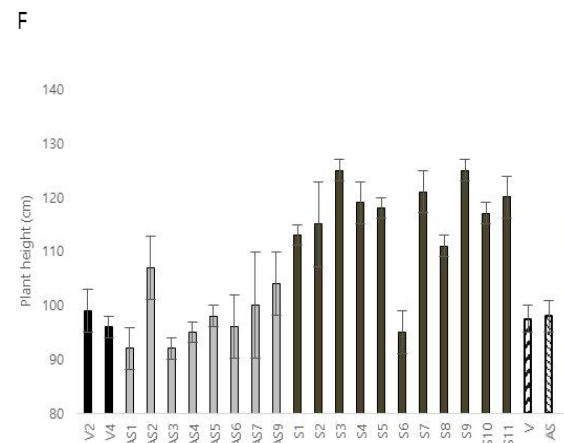
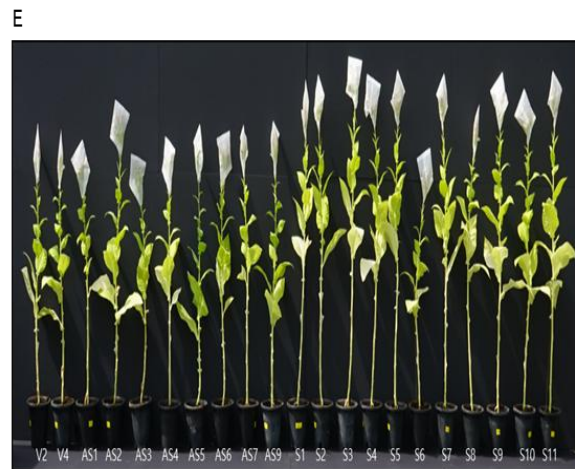
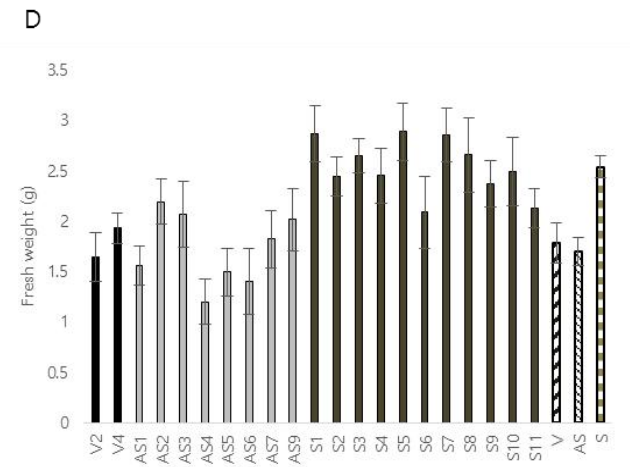
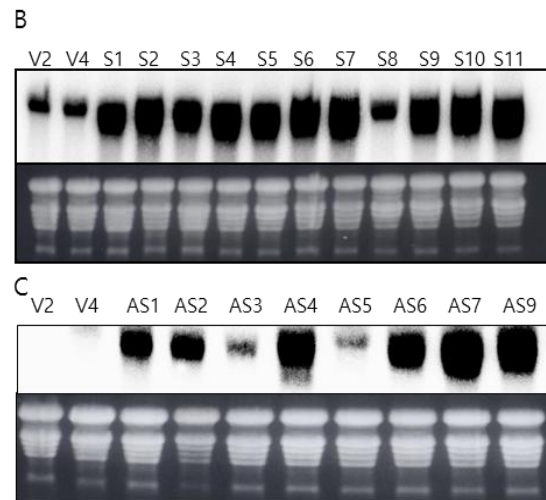
*NtARF1*의 식물체 내에서의 기능을 확인 하기 위하여, *NtARF1*을 과다발현시킨 형질전환체 담배를 제작하였다. *NtARF1*의 ORF는 식물 발현 vector인 pBKS1-1의 CaMV 35S 프로모터의 제어 하에 각각 정방향 및 역방향으로 위치하였고 *Agrobacterium*을 이용해 담배에 형질전환 시켰다(그림 22A). *NtARF1* 형질전환체 담배로 추정되는 식물체들은 카나마이신을 포함하는 배지에서 선별 후 다시 sense 또는 anti-sense *NtARF1*를 <sup>32</sup>P로 표지한 탐침DNA를 사용한 RNA blot분석으로 형질전환이 되었는지 확인 하였다. 형질전환이 확인된 *NtARF1* 형질전환체 담배는 일반적인 성장환경에서 성장하여 자가수분을 통해 T<sub>2</sub>세대의 형질전환체담배를 얻는데 사용되었다. anti-sense *NtARF1*를 탐침자로 활용한 RNA blot결과에서 vector 대조군을 포함한 sense *NtARF1* 형질전환체 담배에서 모두 *NtARF1*의 발현이 이루어지지만, vector 대조군과 비교하여 sense *NtARF1* 형질전환체 담배에서 *NtARF1*의 발현 양이 뚜렷하게 강한 것을 확인 할 수 있다(그림 22B). Vector 대조군과 8번 형질전환 식물체에서 확인된 밴드는 식물체내에서 일반적으로 발현되는 *NtARF1*의 전사물일 것이라 예상 된다. Anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배에서 anti-sense *NtARF1* 전사물의 발현은 sense *NtARF1*를 탐침자로 활용한 RNA blot결과로 확인되었다. 그 결과 vector 대조군에서는 일반적으로 anti-sense *NtARF1* 전사물이 존재하지 않기 때문에 탐지되지 않는 것이 확인되었고, 8개의 anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배에서 모두 anti-sense *NtARF1* 전사물이 발현되는 것이 확인되었다(그림 22C).



**그림 22.** *NtARF1*을 과다발현한 형질전환체 담배의 제작. A) *NtARF1* 유전자를 식물체에서 과다발현시키기 위해 사용된 식물 발현 벡터 pBKS1-1/*NtARF1*의 유전자 지도이다. Pnos, nopaline synthase 유전자의 promoter; NPT, neomycin phosphotransferase 유전자; P35S, cauliflower mosaic virus 35S transcript의 promoter; Tnos, nopaline synthase 유전자의 terminator; Kan<sup>R</sup>, kanamycin resistance gene; RB, T-DNA right border; LB, T-DNA left border. B) Sense 방향의 *NtARF1*의 ORF를 과다발현하는 T<sub>1</sub> 세대의 형질전환 식물체의 RNA-blot결과이다. C) Anti-Sense 방향의 *NtARF1*의 ORF를 과다발현하는 T<sub>1</sub> 세대의 형질전환 식물체의 RNA-blot결과이다. RNA blot 분석 결과에는 실험에 사용된 식물체에서 추출한 20  $\mu$ g의 total RNA를 1.2% agaros gel에 전기영동하였으며 EtBr staining하였다.

## *NtARF1*의 과다발현과 식물생장의 연관관계

*NtARF1*을 과다발현 시킨 형질전환 담배는 RNA blot 결과에서 vector 대조군과 비교하여 높은 수준으로 *NtARF1*을 발현하고 있으며, 이들 형질전환 식물체는 vector 대조군에 비해 형태적 차이가 있는 것이 확인 되었다(그림 23A-C). 일반적인 성장환경에서 25일간 배양한 *NtARF1* 형질전환체 담배의 생체량을 비교한 결과에서, sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 생체량은  $2.53 \pm 0.11$  g이므로 vector 대조군의 생체량인  $1.79 \pm 0.2$  g에 비하여 생체량의 뚜렷한 증가를 확인 할 수 있었다. 반면에 anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배와 vector 대조군을 비교하였을 때는 각각의 생체량이  $1.7 \pm 0.14$  g,  $1.79 \pm 0.2$  g이므로 통계적인 차이가 없었다(그림 23D). 그리고 완전히 성숙한 sense *NtARF1* 형질전환 식물체의 높이는  $116.3 \pm 3.5$  cm이므로 vector 대조군의 식물체의 높이인  $97.5 \pm 2.5$  cm에 비하여 식물체의 높이가 뚜렷하게 증가한 것을 확인 할 수 있었다. 반면에 anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배와 vector 대조군을 비교하였을 때는 각각의 식물체의 높이는  $98.0 \pm 2.9$  cm,  $97.5 \pm 2.5$  cm이므로 통계적인 차이가 없었다(그림 23E, F). 또한 성숙한 식물체에서 발달된 꽃의 개수 또한 통계적 차이를 보이는 것이 확인되었다. Sense *NtARF1* 형질전환체 담배는  $13.5 \pm 1.7$ , vector 대조군은  $8.5 \pm 1.3$ , anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배는  $7.4 \pm 1.4$ 개의 꽃을 생성하였다(그림 23G). 결과적으로 *NtARF1*의 과다발현은 형질전환식물체의 성장속도의 증가와 함께 식물체의 높이가 더 증가하며 더 많은 꽃의 발달에 영향을 주는 것이 확인되었다.



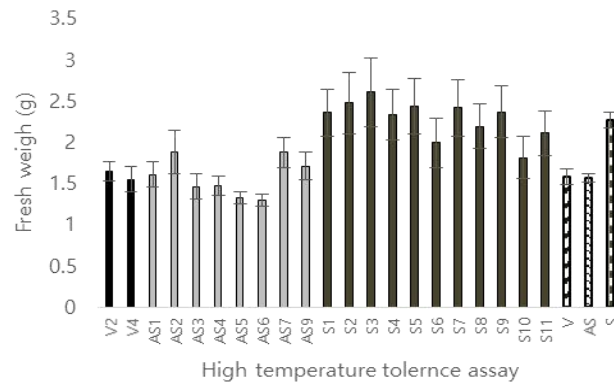
**그림 23.** *NtARF1*을 과다발현한 형질전환체 담배와 vector 대조군의 생체량 및 표현형의 비교 분석. A) *NtARF1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 형태적 비교 결과이다. B) T<sub>2</sub> 세대의 *NtARF1* 형질전환체 담배의 sense line에서 *NtARF1*이 강하게 발현이 되는 것을 RNA blot 분석을 통해 확인하였다. RNA blot 분석 결과에는 실험에 사용된 식물체에서 추출한 20  $\mu$ g의 total RNA를 1.2% agaros gel에 전기영동하였으며 EtBr staining하였다. C) T<sub>2</sub> 세대의 *NtARF1* 형질전환체 담배의 anti-sense line에서 anti-sense *NtARF1* 전사물이 강하게 발현이 되는 것을 RNA blot 분석을 통해 확인하였다. RNA blot 분석 결과에는 실험에 사용된 식물체에서 추출한 20  $\mu$ g의 total RNA를 1.2% agaros gel에 전기영동하였으며 EtBr staining하였다. D) 일반생장 조건에서의 sense *NtARF1* 형질전환체 담배, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군의 생체량 비교 분석 결과이다. sense *NtARF1* 형질전환체 담배는 다른 두 개의 대조군 식물체들과 비교하여 생체량의 통계적인 증가가 확인되었다. 그래프 우측의 V는 vector 대조군 line들의 평균 생체량 값을 의미하며 AS는 anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배 line들의 평균 생체량 값을 의미하고 S는 sense *NtARF1* 형질전환체 담배 line들의 평균 생체량 값을 의미한다. E) 성숙한 sense *NtARF1* 형질전환체 담배, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군의 식물 높이 비교. F) 성숙한 sense *NtARF1* 형질전환체 담배, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군의 식물 높이 비교. sense *NtARF1* 형질전환체 담배는 다른 두 개의 대조군 식물체들의 식물 높이와 비교하여 통계적인 증가가 확인되었다. 그래프 우측의 V는 vector 대조군 line들의 평균 식물 높이를 의미하며 AS는 anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배 line들의 평균 식물 높이를 의미하고 S는 sense *NtARF1* 형질전환체 담배 line들의 평균

식물 높이를 의미한다. G) Sense *NtARF1* 형질전환체 담배, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군이 생성하는 꽃의 개수 비교 결과. 그래프 우측의 V는 vector 대조군 line들의 평균 꽃의 개수를 의미하며 AS는 anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배 line들의 평균 꽃의 개수를 의미하고 S는 sense *NtARF1* 형질전환체 담배 line들의 평균 꽃의 개수를 의미한다. 오차막대는 95% 신뢰구간을 의미한다. V는 vector 대조군을 의미하며 AS는 anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배를 의미하고 S는 sense *NtARF1* 형질전환체 담배를 의미한다.

## *NtARF1*의 과다발현과 형질전환 식물체의 비생물 스트레스 내성의 증가와의 상관관계

일반적인 성장환경에서 *NtARF1* 형질전환체 담배는 대조군과 비교하여 성장률에서 통계적으로 큰 차이를 보이며 높은 성장률에 의해서 비생물 스트레스조건에서 생체량의 통계적 증가가 확인 되었다. 고온스트레스 조건에서 sense *NtARF1* 형질전환체 담배는  $2.28 \pm 0.09$  g, vector 대조군은  $1.6 \pm 0.10$  g, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배는  $1.57 \pm 0.06$  g의 생체량이 측정되어 고온스트레스조건에서 sense *NtARF1* 형질전환체 담배가 높은 성장률에 의해 vector 대조군과 비교하여 생체량의 통계적 증가가 확인되었다(그림 24A-D). 건조스트레스 조건에서 sense *NtARF1* transgenic 형질전환체 담배의 생체량은  $1.91 \pm 0.11$  g이며 vector 대조군의 생체량은  $1.58 \pm 0.16$  g이고 anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 생체량은  $1.12 \pm 0.10$  g이므로 sense *NtARF1* 형질전환체 담배가 건조스트레스에서 높은 성장률에 의해 vector 대조군과 비교하여 생체량의 통계적 증가가 확인되었다(그림 25A-D). 저온스트레스 조건에서 sense *NtARF1* 형질전환체 담배는  $2.00 \pm 0.12$  g, vector 대조군은  $1.42 \pm 0.23$  g, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배는  $1.37 \pm 0.10$  g의 생체량이 측정되어 저온스트레스조건에서 sense *NtARF1* 형질전환체 담배가 높은 성장률에 의해 vector 대조군과 비교하여 생체량의 통계적 증가가 확인되었다(그림 26A-D). 고염스트레스 조건에서 sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 생체량 및 뿌리 길이는 0 mM NaCl에서 100 mM NaCl까지 vector 대조군 및 anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배에 비해 더 높은 것을 확인 할 수 있다(그림 27A, B). 0 mM NaCl 에서 sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 생체량은  $0.081 \pm 0.006$  g,

A



B



C



D



그림 24. *NtARF1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 고온스트레스조건에서의 생체량 비교 분석. A) 고온스트레스에서 sense *NtARF1* 형질전환체 담배는 vector 대조군, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 생체량과 비교하여 통계적인 증가가 확인되었다. 그래프 우측의 V는 vector 대조군 line들의 평균 생체량 값을 의미하며 AS는 anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배 line들의 평균 생체량 값을 의미하고 S는 sense *NtARF1* 형질전환체 담배 line들의 평균 생체량 값을 의미한다. B) 3주 배양된 sense *NtARF1* 형질전환체 담배, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군이 고온스트레스에 처리에 사용되었다. C) sense *NtARF1* 형질전환체 담배, anti-



sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군에 44℃의 고온스트레스를 2시간 처리하였다. D) sense *NtARF1* 형질전환체 담배, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군에 고온스트레스 처리 후 2일간 25℃에서 회복시켰다. 오차막대는 95% 신뢰구간을 의미한다. V는 vector 대조군을 의미하며 AS는 anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배를 의미하고 S는 sense *NtARF1* 형질전환체 담배를 의미한다.

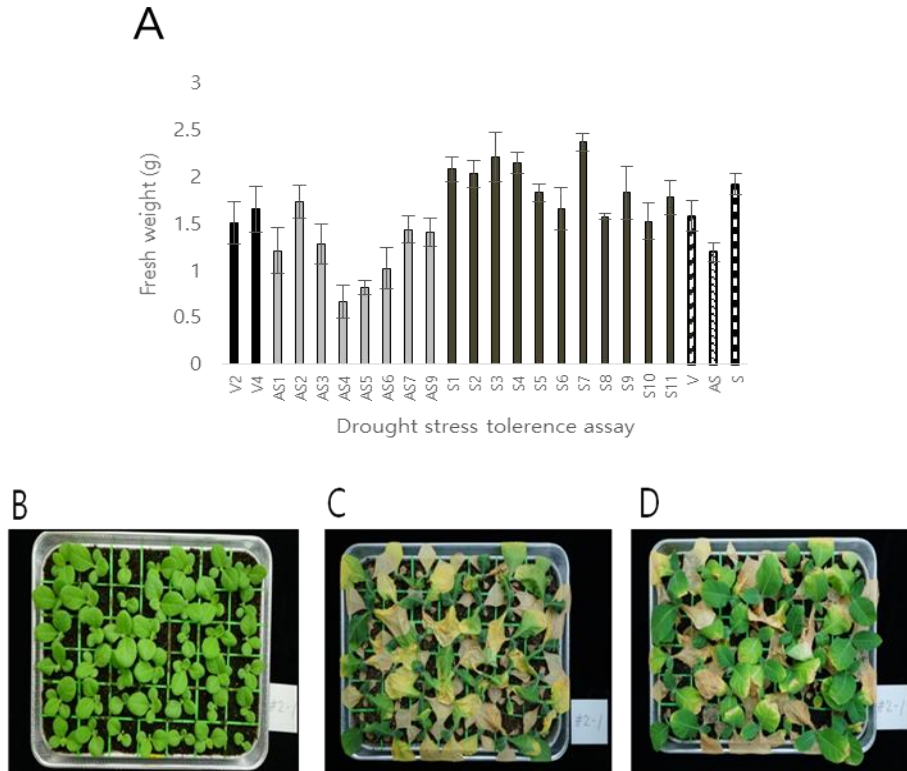
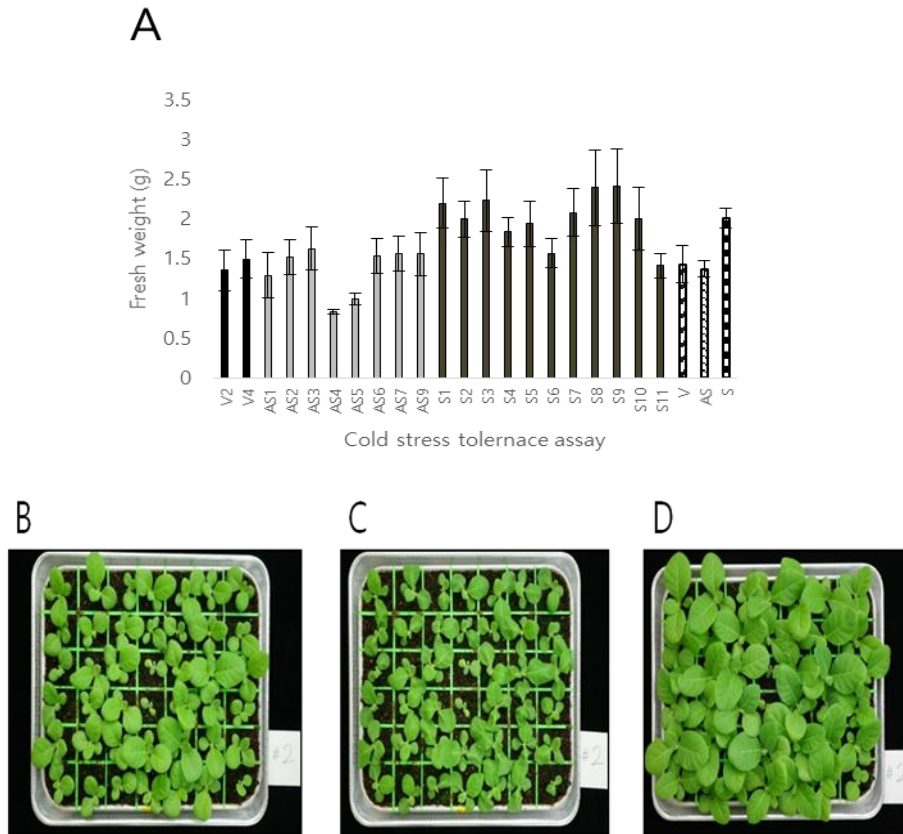


그림 25. *NtARF1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 건조스트레스조건에서의 생체량 비교 분석 결과. A) 건조스트레스에서 sense *NtARF1* 형질전환체 담배는 vector 대조군, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 생체량과 비교하여 통계적인 증가가 확인되었다. 그래프 우측의 V는 vector 대조군 line들의 평균 생체량 값을 의미하며 AS는 anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배 line들의 평균 생체량 값을 의미하고 S는 sense *NtARF1* 형질전환체 담배 line들의 평균 생체량 값을 의미한다. B) 3주 배양된 sense *NtARF1* 형질전환체 담배, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군이 건조스트레스를 처리에 사용되었다. C) sense *NtARF1* 형질전환체 담배, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군에 15일간 25℃에서

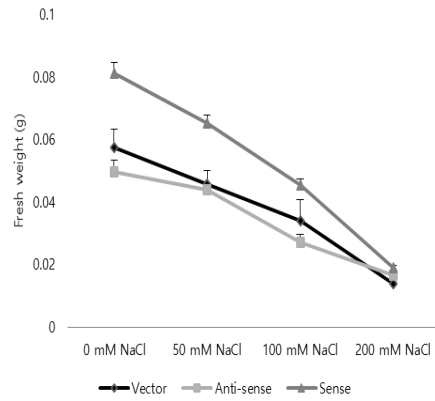
물 공급을 중단하여 건조스트레스처리 하였다 D) sense *NtARF1* 형질전환체 담배, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군에 건조스트레스 처리 후 물을 공급하여 2일간 25℃에서 회복시켰다. 오차막대는 95% 신뢰구간을 의미한다. V는 vector 대조군을 의미하며 AS는 anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배를 의미하고 S는 sense *NtARF1* 형질전환체 담배를 의미한다.



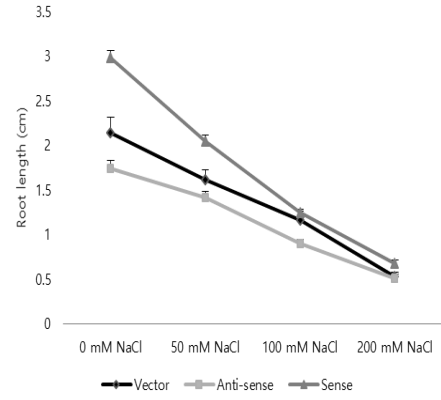
**그림 26.** *NtARF1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 저온스트레스조건에서의 생체량 비교 분석 결과. A) 저온스트레스에서 sense *NtARF1* 형질전환체 담배는 vector 대조군, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 생체량과 비교하여 통계적인 증가가 확인되었다. 그래프 우측의 V는 vector 대조군 line들의 평균 생체량 값을 의미하며 AS는 anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배 line들의 평균 생체량 값을 의미하고 S는 sense *NtARF1* 형질전환체 담배 line들의 평균 생체량 값을 의미한다. B) 3주 배양된 sense *NtARF1* 형질전환체 담배, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군이 저온스트레스에 사용되었다. C) sense *NtARF1* 형질전환체 담배, anti-sense

*NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군에 4℃의 저온스트레스를 4일간 처리하였다. D) sense *NtARF1* 형질전환체 담배, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군에 저온스트레스 처리 후 2일간 25℃에서 회복시켰다. 오차막대는 95% 신뢰구간을 의미한다. V는 vector 대조군을 의미하며 AS는 anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배를 의미하고 S는 sense *NtARF1* 형질전환체 담배를 의미한다.

A



B

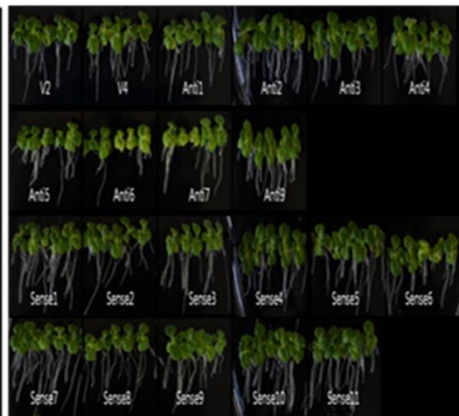


C



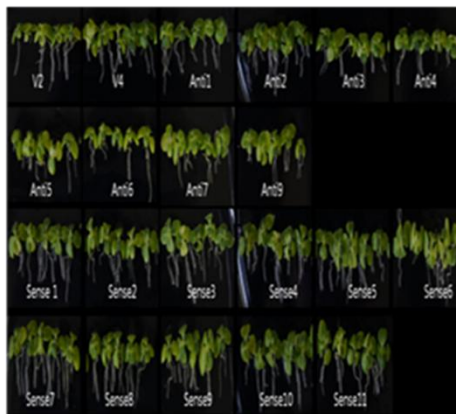
(0 mM NaCl)

D



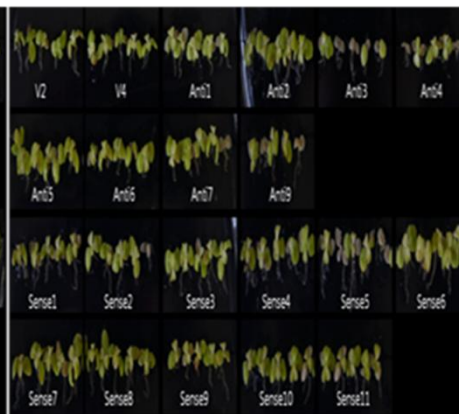
(50 mM NaCl)

E



(100 mM NaCl)

F



(200 mM NaCl)

**그림 27.** *NtARF1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 고염스트레스조건에서의 생체량 및 뿌리길이 비교 분석 결과. A) 0 mM NaCl에서 200 mM NaCl까지의 조건에서 sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 생체량 비교결과. B) 0 mM NaCl에서 200 mM NaCl까지의 조건에서 sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 뿌리길이 비교결과. C) 0 mM NaCl에서 15일간 배양된 sense *NtARF1* 형질전환체 담배, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군의 형태적 비교. D) 50 mM NaCl에서 15일간 배양된 sense *NtARF1* 형질전환체 담배, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군의 형태적 비교. E) 100 mM NaCl에서 15일간 배양된 sense *NtARF1* 형질전환체 담배, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군의 형태적 비교. F) 200 mM NaCl에서 15일간 배양된 sense *NtARF1* 형질전환체 담배, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군의 형태적 비교. V는 vector 대조군 line들의 평균 생체량 값 및 뿌리길이를 의미하며 AS는 anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배 line들의 평균 생체량 값 및 뿌리길이를 의미하고 S는 sense *NtARF1* 형질전환체 담배 line들의 평균 생체량 값 및 뿌리길이를 의미한다. 고염 스트레스는 15일간 서로 다른 농도의 NaCl을 포함한 MS 배지에서 배양된 식물체의 생체량 및 뿌리길이가 측정되었다. 오차막대는 95% 신뢰구간의 양의 값을 의미한다.

$0.060 \pm 0.003$  g,  $0.050 \pm 0.003$  g이므로 뚜렷한 통계적 차이를 보였고 동일한 조건에서 sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 뿌리 길이는  $2.98 \pm 0.08$  cm,  $2.14 \pm 0.17$  cm,  $1.74 \pm 0.09$  cm이므로 역시 통계적으로 큰 차이를 보여 주어, 0 mM NaCl 에서 sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 생체량과 뿌리길이가 vector 대조군 및 anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배와 비교하여 통계적으로 더 높은 것을 확인 할 수 있었다(그림 27A-C). 50 mM NaCl에서 sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 생체량은 각각  $0.065 \pm 0.002$  g,  $0.045 \pm 0.004$  g,  $0.044 \pm 0.002$  g이므로 뚜렷한 통계적 차이를 보였고 동일한 조건에서 sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 뿌리길이는  $2.05 \pm 0.06$  cm,  $1.62 \pm 0.11$  cm,  $1.42 \pm 0.06$  cm이므로 역시 통계적으로 큰 차이를 보여 주었다(그림 27A, B, D). 100 mM NaCl에서 sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 생체량은 각각  $0.046 \pm 0.002$  g,  $0.034 \pm 0.007$  g,  $0.027 \pm 0.002$  g이므로 sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 생체량이 통계적으로 뚜렷한 차이가 확인 되었다. 하지만 동일한 조건에서 sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 뿌리길이는  $1.25 \pm 0.35$  cm,  $1.16 \pm 0.10$  cm,  $0.91 \pm 0.45$  cm이므로 통계적으로 차이를 보여 주지 않았다(그림 27A, B). 100 mM NaCl에서 실험에 사용된 식물개체들이 전체적으로 노랗게 변하면서 식물의 생장이 전체적으로 저해되는 것이 확인 되었다(그림 27A, B, E). 마지막으로 200 mM NaCl에서는 모든 식물들의 생장이 확연히 저해되어 sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군, anti-sense *NtARF1* 형질전환체



담배 간의 통계적 차이가 확인 되지 않았다(그림 27A, B, F). 위의 다양한 비생물 스트레스 조건에서 *NtARF1*을 과다발현 시킨 sense *NtARF1* 형질전환 식물체는 대조군 식물체와 비교하여 높은 생장률에 의해 여러 비생물 스트레스 조건에서 생체량의 통계적 증가를 확인할 수 있었다.

### ***NtARF1*의 과다발현과 종자발아**

*NtARF1*은 고온스트레스에서 발현이 유도된다는 것을 앞선 RT-PCR 분석에서 확인하였다. 기존에 보고된 연구결과에서 식물의 종자 발아에 영향을 주는 환경요건으로 알려진 heat shock을 처리하면 종자의 발아가 유도된다는 결과가 보고되었으므로(Koo et al., 2015) 고온스트레스에서 발현이 유도되는 *NtARF1*이 종자의 발아에 영향을 주는지 확인하기 위하여, *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자를 사용하여 종자 발아 실험을 수행하였다(그림 28). 증류수가 충분히 흡수된 Whatman' s filter paper위에 vector 대조군 및 *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자를 올려 놓고 종자 발아 실험을 수행한 결과, 25℃에서 24시간 배양 후 sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자는  $29.3 \pm 3.2\%$ , vector 대조군의 종자는  $9.0 \pm 2.0\%$ , anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자는  $13.8 \pm 4.0\%$ 로 sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자가 같은 조건에서 더 많이 발아하였다. 28시간 배양 후 sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자는  $51.8 \pm 4.6\%$ , vector 대조군의 종자는  $32.0 \pm 7.8\%$ , anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자는  $28.5 \pm 6.7\%$ 의 발아 비율을 보였으며, 32시간 배양 후 sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자는  $80.0 \pm 3.6\%$ , vector 대조군의 종자는  $59.0 \pm 5.9\%$ , anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자는  $53.5 \pm 11.4\%$ 의 발아 비율을 보였다. 36시간 배양후의 발아 비율은 sense *NtARF1* 형질전환

식물체의 종자는  $91.6 \pm 2.0\%$ , vector 대조군의 종자는  $78.0 \pm 11.8\%$ , anti-sense *NtARF1* 형질전환식물체의 종자는  $75.0 \pm 6.6\%$ 의 발아 비율을 보여 동일한 조건에서 sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자가 대부분 더 빠르게 발아가 완료된 것이 확인되었다. 48시간 배양후에는 sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자 모두 90%이상 발아가 완료되었다(그림 28).

ARF의 활성을 억제하는 것으로 알려진 BFA를 포함시켜 종자 발아율을 확인한 실험결과에서, BFA를 처리한 결과에 의하여 모든 식물체들의 종자 발아율이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 하지만 sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자 발아율은 vector 대조군, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자 발아율과 비교하여 BFA의 영향을 적게 받는 것이 확인되었다. 예를 들어  $4 \mu\text{M}$  BFA조건에서 32시간 배양 후, sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자 발아율은 67%이므로 일반조건에서의 80%의 발아비율에 비해 16% 감소하였고 vector 대조군의 종자 발아율은 38%이므로 일반조건에서의 59%의 발아비율에 비해 36% 감소하였다. anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자 발아율은 36%이므로 일반조건에서의 53%의 발아비율에 비해 32% 감소하였다.  $4 \mu\text{M}$  BFA조건에서 48시간 배양 후, sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자 발아율은 93%이므로 일반조건에서의 98%의 발아비율에 비해 5% 감소하였고 vector 대조군의 종자 발아율은 78%이므로 일반조건에서의 94%의 발아비율에 비해 17% 감소하였다. anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자 발아율은 73%이므로 일반조건에서의 90%의 발아비율에 비해 19% 감소하였다. 또한  $8 \mu\text{M}$  BFA조건에서 32시간 배양 후 sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자 발아율은 70%이므로 일반조건에서의 98%의 발아비율에 비해 29% 감소하였고 vector 대조군의 종자 발아율은

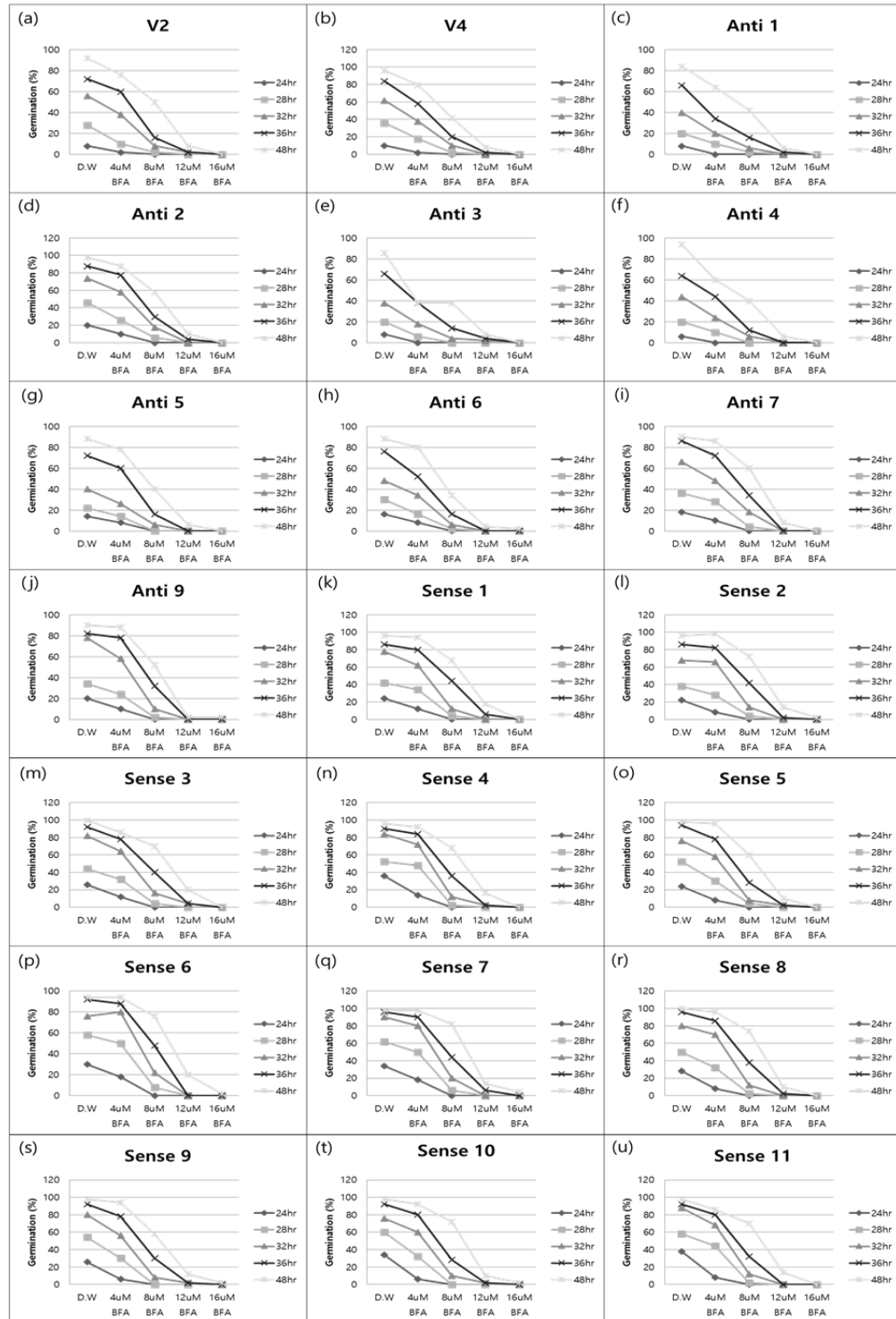
46%이므로 일반조건에서의 94%의 발아비율에 비해 51% 감소하였다. anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자 발아율은 49%이므로 일반조건에서의 90%의 발아비율에 비해 46% 감소하였다(그림 28B). 결과적으로 ARF의 활성을 억제하는 BFA를 처리한 결과, ARF의 기능을 억제하였을 경우 종자 발아에 심각한 영향을 주어 발아가 정상적으로 이루어지지 않았다. 하지만 동일한 농도의 BFA에서 *NtARF1*을 과다발현시킨 sense *NtARF1* 형질전환 식물체의 종자는 vector 대조군 및 anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자보다 BFA에 영향을 더 적게 받는 것이 확인되었다.

#### ***CaPP2C* 형질전환체 담배와 *NtARF1* 형질전환체 담배의 유전자 발현양상 비교**

*CaPP2C* 형질전환체 담배와 sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 유전자 발현양상을 비교한 결과, 두 종의 형질전환 식물체는 서로 다른 유전자 발현양상을 보인다. *CaPP2C* 형질전환체 담배의 전사체 분석 결과에서, *CaPP2C*의 과다발현으로 인하여 높은 수준으로 상향 조절되는 8개의 유전자들을 선택하여 이들의 유전자 발현양상을 두 종의 형질전환 식물체에서 각각 확인한 결과, *CaPP2C* 형질전환 식물체는 전사체 분석결과와 마찬가지로 8개의 유전자 모두 vector 대조군과 비교하여 발현양이 높은 것을 확인 할 수 있었다. Sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 경우에는 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid phytyltransferase으로 알려진 At1g60600, RHD SIX-LIKE 1 (RSL1)으로 알려진 At5g37800, Kelch repeat superfamily protein으로 알려진 At5g51250, U-box protein인 At2g45135 유전자들이 vector 대조군과 비교하여 sense *NtARF1* 형질전환체 담배에서 발현양이 높았다. 하지만 Regulatory particle triple-A ATPase 4a (RPT4a)인

At5g43010, DnaJ-domain superfamily protein인 At5g03030 유전자는 vector 대조군과 비교하여 sense *NtARF1* 형질전환체 담배에서 비슷한 수준의 발현양을 보였으며 Embryonic flower 2 (EMF2)인 At5g51230 유전자는 sense *NtARF1* 형질전환체 담배에서 발현이 되지 않았다. 결과적으로 두 종의 형질전환 식물체는 각각의 유전자의 과다발현으로 인하여 서로 다른 유전자들의 발현을 조절 하는 것이 확인 되었다(그림 29).

A



B

## Seed germination rate

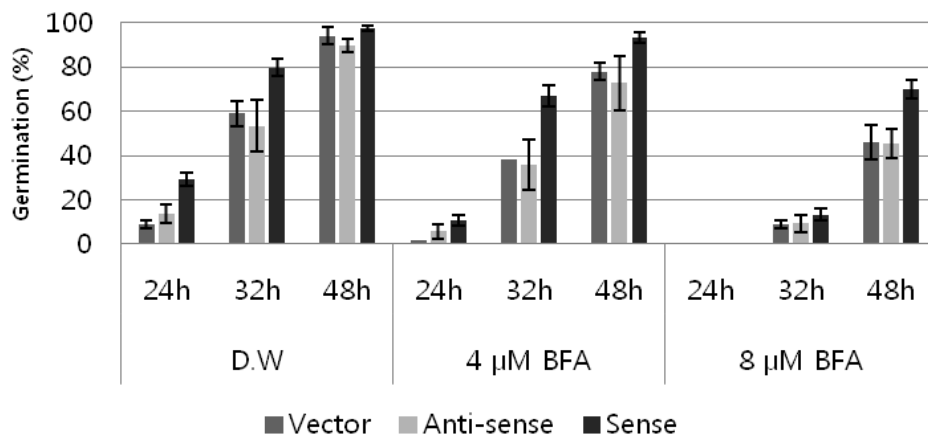


그림 28. *NtARF1* 형질전환체 담배와 vector 대조군의 종자의 발아비율 비교 분석. A) 모든 식물의 종자는 증류수, 4 μm BFA, 8 μm BFA, 12 μm BFA, 16 μm BFA의 조건에서 종자 발아 비율을 확인 하였으며 24, 28, 32, 36, 48시간에서 각각의 종자들의 발아 비율을 확인 하였다. B) sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배종자의 발아 비율을 비교한 결과. sense *NtARF1* 형질전환체 담배는 vector 대조군, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자 발아비율과 비교하여 통계적인 증가가 확인되었다. 한번의 실험에는 50개의 종자가 사용 되었고 총 2번의 반복실험을 수행하였다. 오차막대는 95% 신뢰구간을 의미 한다.

표 5. *CaPP2C*와 *NtARF1* 형질전환체 담배에서의 유전자 발현 비교를 위한 primer 서열

Name	sequence (5'-3')
NtARF1-F	TGATGCAGATTGTAT
NtARF1-R	GGAGATGTTCATAACCA
At1g60600-F	AACACCAAGCGCTAGCGAT
At1g60600-R	AGTAGTAAATCTGGTTGGAAGC
At5g37800-F	TTTATTGCCAGCCAGTTTAG
At5g37800-R	CTCTGGTTCAACTATTGTAAA
At5g51250-F	CTCTGGTTCAACTATTGTAAA
At5g51250-R	GTGTATGCTTACAAGGAAGG
At2g45135-F	TTCAAGAGTTATCCTAGGGTT
At2g45135-R	GCGCATATCACTCCCGT
At5g43010-F	GAATCCCTCTGCAAGTTTG
At5g43010-R	CCATGCAGCTGGTATCGC
At5g03030-F	AGGAACACGAGGTCTTGC
At5g03030-R	AGGAACACGAGGTCTTGC
At5g51230-F	CTAATCCAAGATGAGGCC
At5g51230-R	AAAAAATTCAGACGGAGGAG

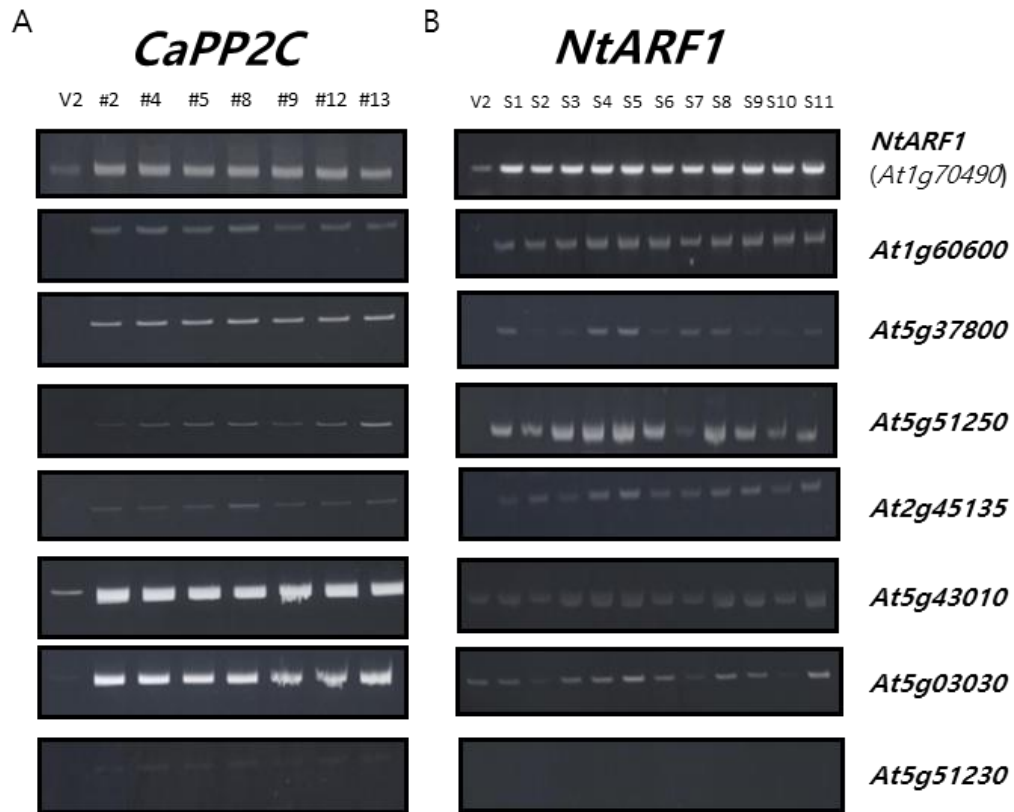


그림 29. *CaPP2C* 형질전환체 담배와 *NtARF1* 형질전환체 담배에서의 유전자 발현 양상 비교 결과. A) *CaPP2C* 형질전환체 담배의 전사체 분석결과에서 상향조절되고 있는 8개의 유전자는, RT-PCR 분석 결과에서 대조군과 비교하여 *CaPP2C* 형질전환체 line에서 발현양이 높은 것을 확인 하였다. B) *NtARF1* 형질전환체 담배의 sense line에서 *NtARF1*, *At1g60600*, *At5g37800*, *At5g51250*, *At2g45135* 유전자들은 대조군과 비교하여 발현양이 높고 *At5g43010*, *At5g03030* 유전자는 대조군과 발현양이 비슷하다. *At5g51230* 유전자는 발현되지 않았다. RT-PCR 분석 결과에 사용된 primer의 서열은 표 5에 나와있다.



## 고찰

ARF는 진핵생물에서 vesicle trafficking에 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다. Vesicle trafficking은 단백질 이동, 신호전달, 다양한 발달 과정등에 반드시 필요한 과정이며(Yao and Xue, 2011) 식물에서 ARF의 생리학적인 기능은 cell proliferation, epidermal cell polarity, endocytosis등을 조절하는 것으로 알려져 있다(Gebbie et al., 2005; Xu and Scheres, 2005; Naramoto et al., 2010). 최근에 고염, 건조, 저온 스트레스등에 의하여 몇몇의 벼 ARF 유전자가 약하게 발현이 유도된 사실을 확인 되었지만(Muthamilarasan et al., 2016) 아직까지 ARF와 비생물 스트레스와의 연관성에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 본 연구에서 비생물 스트레스에 의해 발현이 유도되는 *CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1*을 각각 과다발현시킨 형질전환체 담배에서 ARF 유전자가 공통적으로 상향조절 되므로 비생물 스트레스에서 ARF가 기능을 할 것이라 예상하여 담배에서 ARF 유전자를 분리하였다. 담배에서 분리한 9개의 NtARF 유전자들은 ORF의 염기서열이 높은 수준으로 유사성을 갖고 있었으며 이중 *NtARF1*이 *CaPP2C* 형질전환체 담배에서 높은 수준으로 발현이 이루어 지는 것을 확인 하였고 *NtARF1*의 전사물이 고온스트레스에 의해 직접적으로 발현이 유도 되었다. 때문에 *NtARF1*이 비생물 스트레스에서 기능을 할 것이라 예상되어 *NtARF1*을 과다발현 시킨 형질전환체 담배를 제작하였다. *NtARF1* 형질전환체 담배는 vector 대조군과 비교하여 높은 수준으로 *NtARF1*을 발현하고 있으며 *NtARF1* 형질전환체 담배는 *CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1*을 과다발현 시킨 3종의 형질전환체 담배와 비교하여 생장률에서 많은 차이를 보여주었다. 일반생장 조건에서 sense *NtARF1* 형질전환체 담배는 vector 대조

군 및 anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배와 비교하여 생체량의 뚜렷한 통계적 증가가 이루어 졌으며, 성숙한 식물체들의 높이 비교에서도 통계적인 차이를 보여주었다. 또한 sense *NtARF1* 형질전환체 담배는 vector 대조군 및 anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배와 비교하여 각각의 식물체에서 발달된 꽃의 개수에도 통계적 차이를 보여주었다. 결과적으로 *NtARF1*의 과다 발현은 식물의 생장률을 증가시켜 같은 조건에서 생장한 대조군들보다 생체량 및 식물의 높이에서 차이를 보이게 되고, *NtARF1*의 과다발현으로 식물의 꽃의 발달이 영향을 받아 더 많은 꽃의 생성이 이루어 지는 것이라 예상된다. 식물체 내에서 ARF 유전자는 식물의 대부분의 조직에서 발현되지만 뚜렷하게 특정 조직에서 발현양의 차이를 보이지는 않는다. 기존에 보고된 식물에서의 ARF의 기능중 애기장대의 anti-sense ARF 유전자를 과다발현시킨 형질전환체 식물은 ARF에 의한 vesicle trafficking에 결함이 발생하여 세포분열, 세포팽창, 셀룰로오스의 형성이 억제되어 식물 생장이 억제되는 부정적 영향이 발생하였다(Gebbie et al., 2005). 옥수수 ARF인 ZmARF 유전자를 애기장대에 과다발현시킨 형질전환 식물체는 식물의 생장률이 증가하고 종자의 크기가 증가 하므로(Yuan et al., 2013; Wang et al., 2016), CaMV 35S 프로모터를 이용한 *NtARF1*의 과다발현은 형질전환 식물체의 모든 조직에서 *NtARF1* 유전자를 과다발현시키므로 *NtARF1*의 과다발현이 vesicle trafficking을 강화하여 식물의 생장에 긍정적 영향을 주어 대조군 식물체들과 비교하여 높은 생장률을 보이는 것이라고 예상 된다. *NtARF1*의 과다발현은 형질전환 식물체의 생장률의 변화에 의하여 비생물 스트레스에 대한 내성 증가에도 영향을 주었다. 1장에서 3종의 형질전환체 담배들은 비생물 스트레스에서 vector 대조군과 비교하여 통계적인 차이가 확인되지 않았다. 하지만 *NtARF1*의 과다발현으로 고온, 건조, 저온 스트레스조건에서 높은 생장률을

가진 sense *NtARF1* 형질전환체 담배는 vector 대조군, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배와 비교하여 생체량의 통계적 증가가 확인되었다. 또한 고염스트레스조건인 50 mM NaCl에서 sense *NtARF1* 형질전환체 담배가 vector 대조군 및 anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배와 비교하여 생체량과 뿌리 길이가 통계적으로 증가된 것이 측정 되었으며 이러한 차이는 100 mM NaCl에서도 관찰 되었다. 하지만 200 mM NaCl에서는 모든 식물의 성장이 저해되어 sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배간의 통계적 차이를 찾을 수 없었다. 결과적으로 *NtARF1*의 과다발현이 sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 생장률 증가에 영향을 주어 고온, 건조, 저온, 고염스트레스에서 대조군 식물체와 비교하여 *NtARF1* 형질전환 식물체의 생체량 증가로 이어진 것이 확인 되었다.

*NtARF1*의 과다발현은 식물체의 생장률의 증가와 함께 종자 발아에 영향을 주는 것이 확인 되었다. 일반 생장 조건에서 sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자가 vector 대조군 및 anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자와 비교하여 종자의 발아의 속도가 차이나는 것이 관찰되었다. 이러한 현상은 ARF의 활성을 억제하는 BFA를 처리하였을 경우에도 관찰 되었다. BFA에 의해서 ARF의 활성이 억제되면, 모든 종자들의 발아 비율이 전체적으로 감소하였지만 vector 대조군과 anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자는 sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자와 비교하여 더 심각하게 영향을 받는 것이 확인되었다. 예를 들어 4  $\mu$ M BFA에서 종자들을 32시간 배양 후 sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대조군, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자 발아 비율은 66.9%, 38.0%, 35.8%이므로 각각 BFA가 없는 조건보다 16%, 36%, 33%의 감소가 확인되었다. 8  $\mu$ M BFA에서 종자들을 48 배양 후 sense *NtARF1* 형질전환체 담배, vector 대

조건, anti-sense *NtARF1* 형질전환체 담배의 종자 발아 비율은 각각 70.0%, 46.0%, 45.5%이므로 BFA가 없는 조건보다 29%, 51%, 49% 감소하였고 더 높은 농도의 BFA조건에서는 모든 식물체의 종자 발아가 모두 급격히 감소한 것이 확인 되었다(그림 28A). 이 결과를 통하여 ARF의 활성을 억제하였을 경우 종자 발아가 원활히 이루어지지 않는 것을 확인 할 수 있었다. 하지만 *NtARF1*의 과다발현으로 인하여 종자 발아비율의 감소가 둔화되므로 *NtARF1*이 종자 발아에 영향을 주는 것을 확인 할 수 있었다.

본 연구에서 다양한 비생물 스트레스에 발현이 유도되는 *CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1*을 과다발현시킨 형질전환체 담배는 비생물 스트레스에 내성을 보이지 않았다. 하지만 3종의 형질전환 식물체에서 공통적으로 상향 조절되는 *NtARF1*을 과다발현시킨 *NtARF1* 형질전환 식물체는, 성장률의 증가와 함께 생장률의 증가에 의해 비생물 스트레스에 내성이 증가하였고 빠른 종자 발아율을 보였다. 3개 유전자는 비생물 스트레스에서 강하게 발현이 유도되며 3종의 형질전환체 담배 또한 *NtARF1*을 높은 수준으로 상향조절한다. 하지만 단독으로 *NtARF1*을 과다발현시킨 형질전환체 담배와 비교하여 생장률에는 서로 큰 차이를 보였다. 식물에서 비생물 스트레스에 의해 발현이 유도되는 유전자를 분석한 결과에서 애기장대에 저온, 건조, 고염 스트레스를 각각 가한 결과 대부분의 스트레스는 각각의 스트레스에 특이적인 유전자들의 발현이 대부분 이루어 졌다(Seki et al., 2002). 이는 애기장대 뿐만 아니라 다른 식물에서도 확인 되었다. 옥수수에 고염, 건조, 고온, 저온의 스트레스를 가하였을 때 4개의 스트레스조건에서 대부분의 유전자들은 특정 스트레스 조건에서만 발현이 유도 되지만 그 중에서 소수의 유전자들은 공통적으로 상향 조절되는 것이 확인 되었고, 여기에는 비생물 스트레스에 기능을 갖는 ERF, NAC, MYB, HD-ZIP등의 전사인자들도 포함이 되었다(Li et al.,

2017). 이렇게 다양한 스트레스에 의해 공통적으로 발현이 유도되는 유전자들은 비생물 스트레스에 대한 반응과정에서 중요한 역할을 하기 때문에 일부 신호전달 과정을 서로 공유 하여 다양한 스트레스 조건에서 공통적으로 발현이 유도되는 것이라 예상 된다. 본 연구에서 *CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1* 역시 다양한 비생물 스트레스에 발현이 유도되므로 이들 역시 식물체 내에서 신호전달에 중요한 공통 구성요소로 작용 할 것이라 예상 되며 이들의 공통 하위 유전자인 *NtARF1*은 여러 비생물 스트레스 신호전달의 공통 구성요소인 *CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1*의 하위 조절자로서 기능하는 것이라 예상 된다. *CaPP2C*, *CaMPK1*, *CaBI-1*는 다양한 비생물 스트레스에 의해 발현이 유도되어 다양한 하위 유전자의 발현을 조절하지만, 이들의 과다발현에 의한 광범위한 유전자들의 발현은 식물의 신호전달에서 혼란을 야기하여 부정적 영향으로 인하여 식물의 생장률 및 비생물 스트레스에 내성을 갖지 못하는 것이라 예상한다. 하지만 *CaPP2C*, *CaMPK1*, *CaBI-1*의 하위유전자인 *NtARF1*은 *CaPP2C*, *CaMPK1*, *CaBI-1*의 신호전달 과정에서 공통적인 하위 조절자로서 기능하여 *NtARF1*의 과다 발현으로 인하여 식물의 생장에 영향을 주는 유전자의 발현이나 호르몬이 조절되어 대조군 식물체와 비교하여 높은 생장률을 보이고 높은 생장률은 비생물 스트레스에서의 내성증가에 도움이 되는 것으로 예상된다. 때문에 *CaPP2C*, *CaMPK1*, *CaBI-1*의 형질전환체 담배가 *NtARF1*을 높은 수준으로 발현하고 있어도 단독으로 *NtARF1*을 과다발현 시킨 형질전환체 담배와 식물체 내에서 조절되는 유전자 발현양상에 차이를 보여, 이러한 차이가 형질전환 식물체의 생장률 차이에 영향을 주는 것이라 예상된다. *CaPP2C* 형질전환체 담배의 전사체 분석결과에서 높은 수준으로 상향조절된 8개 유전자들의 발현양상을 *CaPP2C* 형질전환체 담배와 sense *NtARF1* 형질전환체 담배에서 RT-PCR 분석을 통해 확인 한

결과(그림 29), 동일한 조건에서 sense *NtARF1* 형질전환체 담배는 *CaPP2C* 형질전환체 담배와 비교하여 각각의 유전자의 발현 양상에 차이를 보이는 것을 확인 할 수 있었다. 두 종의 형질전환 식물체에서 모두 vector 대조군과 비교하여 발현이 높게 되는 유전자중에 하나인 At1g60600은 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid phytyltransferase으로 알려져 있으며 phylloquinone을 생합성하는 enzyme으로 알려져 있고 애기장대에서 해당 유전자가 기능하지 못하는 돌연변이 식물체는 식물의 성장저하와 dwarfish 표현형을 보이는 것으로 알려져 있다(Shimada et al., 2005). At5g37800 유전자에 해당되는 RHD SIX-LIKE 1 (RSL1)은 애기장대에서 뿌리 발달을 조절하여 RSL1의 발현으로 뿌리털의 신장이 조절된다고 알려져 있다(Yi et al., 2010). At5g51250은 kelch repeat superfamily protein으로 알려져 있으며, 이 kelch repeat domain을 포함하는 F-box protein은 E3 ubiquitin ligase complex의 subunit중에 하나이다 (Sun et al., 2007). Kelch repeat F-box (KFB) protein은 세포벽을 구성하는 lignin의 생합성을 조절하는 효소의 활성을 조절하는 것으로 알려져 있다(Zhang et al., 2013). At2g45135 유전자에 해당되는 U-box protein은 식물의 발달 및 호르몬 반응에 관여 하는 것으로 알려져 있다. 이처럼 두 종의 형질전환 식물체에서 모두 발현이 높게 조절되는 유전자들은 식물의 생장에 긍정적으로 관련된 유전자인 것을 확인 할 수 있었다. 반면에 두 종의 형질전환 식물체에서 발현양상이 차이가 나는 유전자중에 하나인 At5g43010에 해당되는 Regulatory particle triple-A ATPase 4a (RPT4a)는 AAA ATPase family로 19S regulatory complex (RP)의 subunit으로 유비퀴틴화 된 기질을 인지하는 것으로 알려져 있다(Fu et al., 1999; Shibahara et al., 2002). 19S RP 는 20S proteolytic core와 함께 26S proteasome를 구성

하여 protein degradation을 유도하게 된다. 벼의 RPT4인 OsRPT4는 벼의 뿌리 발달에 영향을 주는 OsRAA1과의 상호작용을 통해 OsRAA1의 protein degradation을 조절하는 것으로 보고되었다 (Han et al., 2008). *OsRAA1*은 빠르게 성장하는 meristem에서 많이 발현되어 뿌리 발달에 중요한 역할을 하지만 이들의 과다 발현은 오히려 OsRPT4와의 interaction을 통한 protein degradation이 정확히 이루어 지지 않아 root cell division에서 metaphase의 arrest로 이어져 오히려 primary root에 성장을 감소시켰다. 때문에 *CaPP2C* 형질전환체 담배에서는 *RPT4a*의 높은 발현이 OsRAA1같은 단백질의 기능을 억제하여 식물의 생장에 부정적인 영향을 주게 된다고 생각된다. At5g03030 유전자는 DnaJ-domain superfamily protein으로 알려져 있으며 DnaJ-domain protein은 Hsp40s로 알려져 있다. Hsp40s는 molecular chaperone인 Hsp70s과 함께 protein folding, misfolded protein의 degradation 및 protein translocation등에 관여하는 것으로 알려져 있다(Craig et al., 2006). 담배에서 DnaJ protein은 tobacco mosaic virus (TMV)의 movement protein과 상호작용하는 것으로 알려져 있다 (Shimizu et al., 2009). TMV는 viral movement protein (MP)을 활용하여 세포간 이동이 이루어 지는데 이 viral MP는 다양한 host factor들을 이용하여 하며 tobacco DnaJ-like protein (NtMPIP1)이 TMV MP와 상호작용하여 TMV MP의 folding등을 돕는 것으로 알려져 있다. NtMPIP1의 기능을 억제한 식물체는 TMV의 감염 후 식물체내에서 다른 조직으로의 TMV의 확산 속도가 저하되는 것을 확인 할 수 있었다. 때문에 식물체 내에서 중요한 기능을 담당하지만 *CaPP2C* 형질전환체 담배에서 At5g03030 유전자의 높은 발현이 오히려 식물의 생장에 부정적인 영향을 줄 가능성이 있다고 예상된다. 마지막으로 At5g51230 유전자는 Embryonic flower 2 (EMF2)으로 알려

져 있으며 Polycomb group (PcG) protein을 encoding하는 *EMF2*는 histone modification을 통해 gene silencing을 조절하는 것으로 잘 알려져 있다. 식물에서 *EMF2*는 광합성, 종자 발달, 호르몬 및 스트레스 관련 유전자들을 조절하는 것으로 알려져 있다(Kim et al., 2010). 애기장대의 *emf* mutant에서는 개화에 필요한 유전자들의 발현이 상향 조절되며 ABA 신호전달에 관여한 유전자들의 발현 또한 상향 조절 되므로 ABA 신호전달에 *EMF*가 영향을 주는 것이 확인되었다. 또한 여러 비생물 스트레스에 반응 하는 유전자들의 발현이 *emf* mutant에서 상향 조절되므로 *EMF*는 일반적인 상황에서 epigenetic regulation을 통하여 스트레스가 식물에 가해지기 전까지 스트레스 반응 유전자들의 활성을 억제하여 여러 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. 때문에 *CaPP2C* 형질전환체 담배에서 *EMF2*의 발현이 vector 대조군에 비해 높기 때문에 오히려 비생물 스트레스조건에서 필요한 유전자들의 발현이 원활이 이루어 지지 않기 때문에 *CaPP2C* 형질전환체 담배에서는 비생물 스트레스에 대한 내성을 보이지 않는 것이라 예상된다. 위의 몇몇의 유전자들의 발현을 두 종의 형질전환체 식물에서 비교한 결과에서 서로 다른 유전자 발현 양상을 보이므로 더 많은 유전자들의 발현양상을 비교한다면 더 큰 차이를 보일 가능성이 있을 것이라 예상된다. 그러므로 3종의 형질전환체 담배와 *NtARF1* 형질전환체 담배가 식물체내에서 각각 조절하는 하위유전자는 큰 차이를 보일 것이라 예상 할 수 있다. *NtARF1*은 다양한 비생물 스트레스에 발현이 유도되는 *CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1*의 하위 유전자로서 기능하여 식물의 생장에 관여하는 유전자들의 발현을 조절 하여 식물의 생장과 발달에 영향을 주어 대조군 식물체와 비교하여 생장률의 증가가 이루어 지는 것이라 예상 된다.



### 3장. 야생식물과 작물들에서의 ARF의 분류 및 비교

#### 서론

ADP ribosylation factors (ARFs)는 Ras superfamily에 속하는 small GTP binding protein으로서 다양한 진핵생물에서 잘 보존 되어 있는 것으로 알려져 있다(D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006). ARF는 intracellular vesicle trafficking에 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있으며 vesicle trafficking은 단백질 이동, 신호전달, 다양한 발달 과정 등에 반드시 필요하다(Yao and Xue, 2011). 21 kD의 작은 크기를 갖고 있는 ARF는 두 개의 switch region과 단백질의 N-말단에 미리스토일화 되어 세포막과 연계하여 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, ARF의 기능은 GTP 결합 활성화 상태와 GDP 결합 비활성화 상태를 오가며 조절된다. GEF (guanine nucleotide exchange factor)에 의하여 ARF는 GDP와 GTP의 교환이 이루어지게 되고 GTP- 결합 활성화 상태의 ARF는 COPI complex, clathrin adaptor protein 복합체, phospholipase D 등의 다양한 effector protein들과 상호작용하여 기능을 하는 것으로 알려져 있다(Lee et al., 2005; Shin and Nakayama, 2004; Nakai et al., 2013). 식물에서 ARF의 생리학적 기능은 세포 증식, epidermal cell polarity, endocytosis등을 조절하는 것으로 알려져 있다(Gebbie et al., 2005; Xu and Scheres, 2005; Naramoto et al., 2010). Human에서 ARF의 분류는 아미노산 서열에 의해 크게 2개의 그룹인 ARF와 ARL (ADP-ribosylation factor-like protein)로 나뉘며 각각 6개의 ARF와 14개의 ARL이 존재한다. 그 중

ARF는 다시 3개의 Class으로 나뉘게 된다(Vernoud et al., 2003; Yorimitsu et al., 2014). Class 1과 Class2의 ARF는 골지체에 위치하여 vesicle trafficking에 관여 하는 것으로 알려져 있다. Class 1 ARF는 GEF에 의하여 GTP 결합 활성화 상태로 N-말단에 미리스토일화에 의하여 membrane에 결합한뒤 cargo 분자의 vesicle trafficking을 위해 세포질에서 외피단백질을 recruit하여 COPI 복합체와 결합하고 coat protein의 polymerization에 의하여 vesicle이 형성되면 ARF는 GAP에 의하여 GTP의 가수분해가 이루어져 ARF-GDP형태로 전환되어 막에서 떨어져 나오게 된다. Class 3 ARF는 endocytosis에 관여하는 것으로 알려져 있으며 ARF가 활성화 시킨 phospholipase D (PLD)는 plasma membrane에서 지질 이중층 막을 형성하는 phosphatidyl choline (PC)를 hydrolysis하여 phosphatidic acid (PA)를 생성한다. PA는 vesicle을 형성하는데 필요한 분자들을 recruit하며 외피 단백질에 의하여 vesicle이 형성되어 endocytosis가 이루어 지게 된다(Liscovitch et al., 2000). ARL은 ARF와 비교하여 아직 그 기능이 불분명한 것으로 알려져 있다.

작물의 품종 개량은 오래전부터 지속된 농업 활동으로 동일한 종류의 작물이라도 각각의 개체는 형태적 또는 생리적으로 차이가 존재하므로, 좀더 우수한 작물의 획득을 위하여 많은 작물들의 품종 개량이 지속되어 왔다. 작물은 중요한 식량자원으로서 품종 개량을 통해 작물의 질의 향상과 생산성, 효율성등의 증가를 목표로 수행 되어 왔다. 우수한 형질을 보이는 작물간의 교배에 의한 품종 개량 방식은 많은 주요 작물들의 품종 개량에 이용되어 왔다(Xiong et al., 2015). 하지만 이 방식에는 많은 노력과 시간이 필요로 하므로 극심한 기후 변화에 따른 작물 생산성의 감소는 좀더 효율 적인 품종 개량 방식이 필요하므로, 분자생물학적 방식을 이용한 품종 계량이 시도 되고

있다. 때문에 작물의 품질 개량에 의한 유전적인 변화에 대한 분석은 앞으로의 효율적인 품종개량에 도움이 될 것이다. 본 연구에서 담배의 ARF유전자중 하나인 NtARF1 유전자가 비생물 스트레스에 대한 내성 증가에 긍정적 영향을 주므로 다양한 식물들에서 ARF의 기능을 유추해보고자 전체 유전체의 염기서열이 분석된 주요 작물과 야생 식물종의 유전체 데이터베이스를 활용하여 각각의 식물에서 ARF를 분리하여 계통발생학적 분류를 이용하여 4개의 class로 분류하였다.

## 재료 및 방법

### 아미노산 서열 분석과 비교

아미노산 서열의 Multiple sequence alignment는 Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)에 의해 수행되었으며 아미노산 서열의 비교분석에는 National Center for Biotechnology Information platform (NCBI)의 BLASTP가 이용되었다.

### 작물과 야생식물의 database를 이용한 ARF family protein 분리 및 계통학적 분류

야생식물과 작물들에서 ARF family protein의 정보를 얻기 위하여 해당되는 식물종의 database를 활용하였다. 작물과 야생식물의 선택 기준은 전체 유전체 분석이 수행되었고 유전자의 annotation이 많이 이루어진 많은 개량이 이루어진 작물들과 이들과 계통 분류학적 관련이 있는 야생식물들을 선택하였다. 선택된 식물종들은 다음과 같다. *Glycine max*, *Nicotiana tabacum* (cultivar TN90), *Oryza sativa*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*, *Zea mays*는 활발히 개량이 이루어진 작물들에 속하고 *Arabidopsis thaliana*, *Brachypodium distachyon*, *Medicago truncatula*, *Nicotiana benthamiana*, *Setaria italica*는 model 또는 야생 식물 종에 속한다. *A. thaliana*의 database (TAIR10, <https://www.arabidopsis.org>)와 그 외의 식물 종의 database (Phytozome, <http://www.phytozome.net>, Sol Genomics Network,

<http://solgenomics.net>)에서 BLASTP와 TBLASTN를 활용하여 식물 종 내에서 ARF로 예상되는 모든 ARF family protein를 선별하였으며 이때 e-value는  $1e^{-5}$ 이다. 각각의 식물 종에서 추출한 ARF의 아미노산 서열의 비교는 Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)에 의해 수행되었으며 Clustal W을 통해 분석된 아미노산 서열을 활용하여 MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013)을 이용한 maximum likelihood 방식(Felsenstein, 1981)으로 계통수를 제작하였다. 그리고 branch의 신뢰도를 위하여 bootstrap value는 1,000번 반복하여 분석하였다(Brown, 1994).

## 결과

### 야생식물과 작물들에서의 ARF gene family의 식별 및 계통수를 이용한 분류

ARF의 유전체 정보는 주요 작물, 그리고 이들과 계통 발생적으로 연관이 있는 야생 식물들의 각각의 database를 활용하여 정보를 얻을 수 있었다. Major 작물에는 벼(*O. sativa*), 콩(*G. max*), 옥수수 (*Z. mays*), 감자 (*S. tuberosum*), 토마토(*S. lycopersicum*), 담배(*N. tabacum*)를 선택하였고 이들과 함께 야생 식물종인 *A. thaliana*, *B. distachyon*, *M. truncatula*, *S. italic*, *N. benthamiana*, *M. guttatus*의 database에서 애기장대의 ARF인 At1g70490과 55% 이상의 유사성을 보이는 ARF 단백질들을 선별하였으며 그 결과 총 270개의 ARF를 식물 종들에서 선별 할 수 있었다. 270개의 ARF의 아미노산 서열을 이용하여 계통발생학적 분류를 통해 4개의 class로 분류하였고, 본 연구에서 분리한 9개의 담배 ARF 모두 Class1에 포함되는 것이 확인되었다(그림 30). Class 1에 포함된 ARF family protein는 야생식물이 43, 작물이 78개이며 (그림 31), Class 2에 포함된 ARF family protein는 야생식물이 15, 작물이 6개이며(그림 32), Class 3에 포함된 ARF family protein는 야생식물이 33, 작물이 41개이며(그림 33), Class 4에 포함된 ARF family protein는 야생식물이 22, 작물이 32개이다(그림 34). Class 1에 포함된 ARF들은 GTP-binding motif에 의해 구성된 4개의 domain과 GEF Sec7 interaction domain (switch 1 and 2), GAP interaction domain (effector region)과 함께 N-말단에 미리스토일화 site가 존재하는 것이 확인 되었다. Class 2, 3, 4는

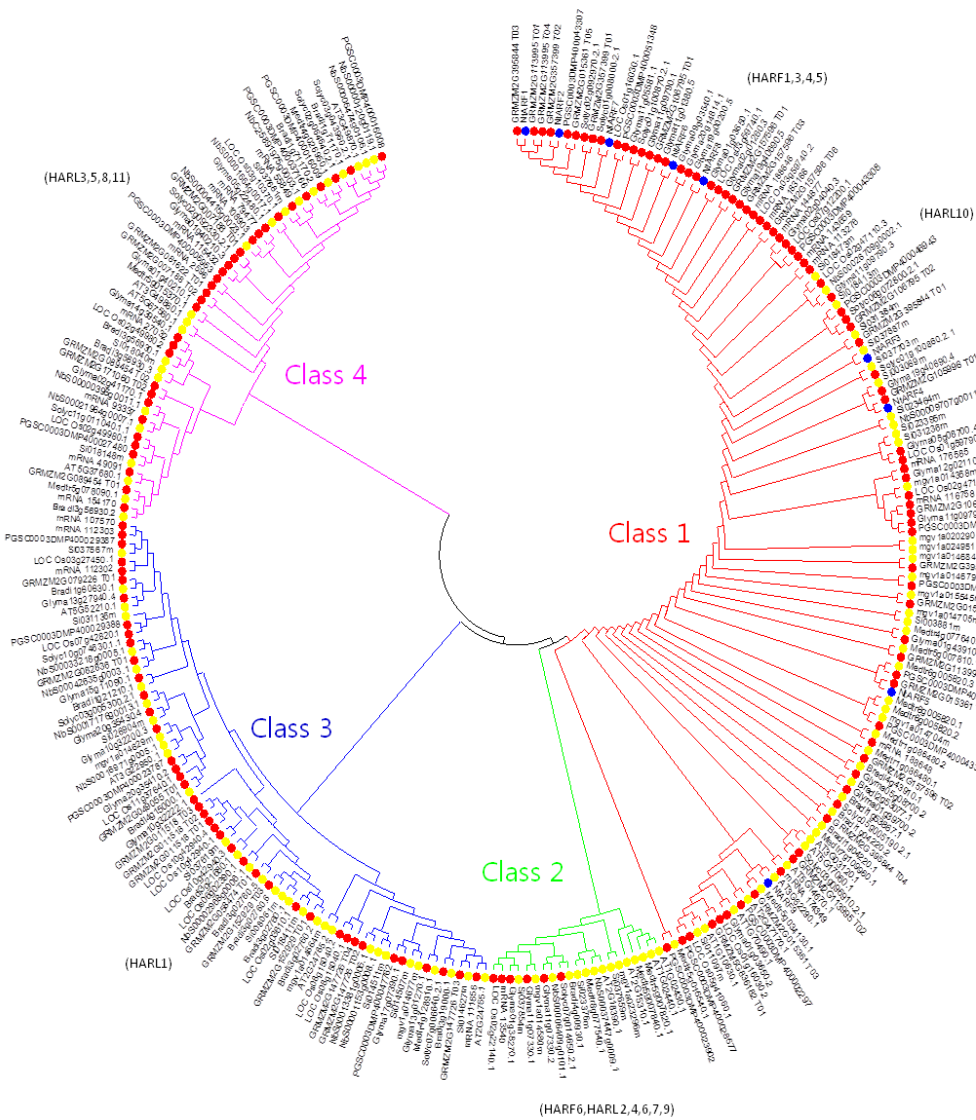


그림 30. 야생 식물과 작물들의 ARF family protein의 unrooted 계통수. ARF family protein에 대한 정보는 *A. thaliana*, *B. distachyon*, *M. truncatula*, *S. italica*, *N. benthamiana*, *M. guttatus*, *O. sativa*, *G. max*, *Z.*

*mays*, *N. tabacum* cv TN90, W38, *S. tuberosum*, *S. lycopersicum*의 database를 이용하였으며 이들의 아미노산 서열은 Clustal W을 이용하여 분석하였고, 분석된 아미노산 서열을 활용하여 MEGA 6.0 을 이용한 maximum likelihood 방식으로 계통수를 제작하였다. 계통수 분석 결과에서 크게 4개의 그룹이 형성되어 Class 1에서 4로 표시하였다. 계통수 주변에는 human ARF들을 괄호 안에 표시하였다.





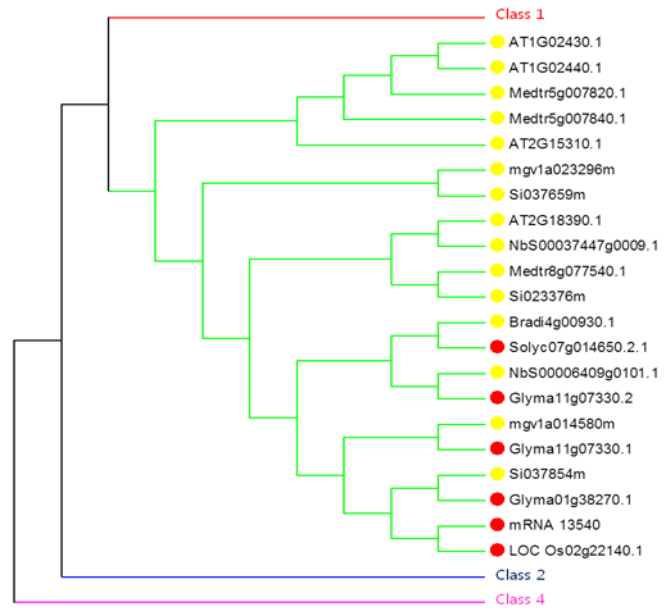


그림 32. 야생 식물과 작물들의 ARF family protein의 unrooted 계통수에서 Class 2에 포함되는 ARF family protein.

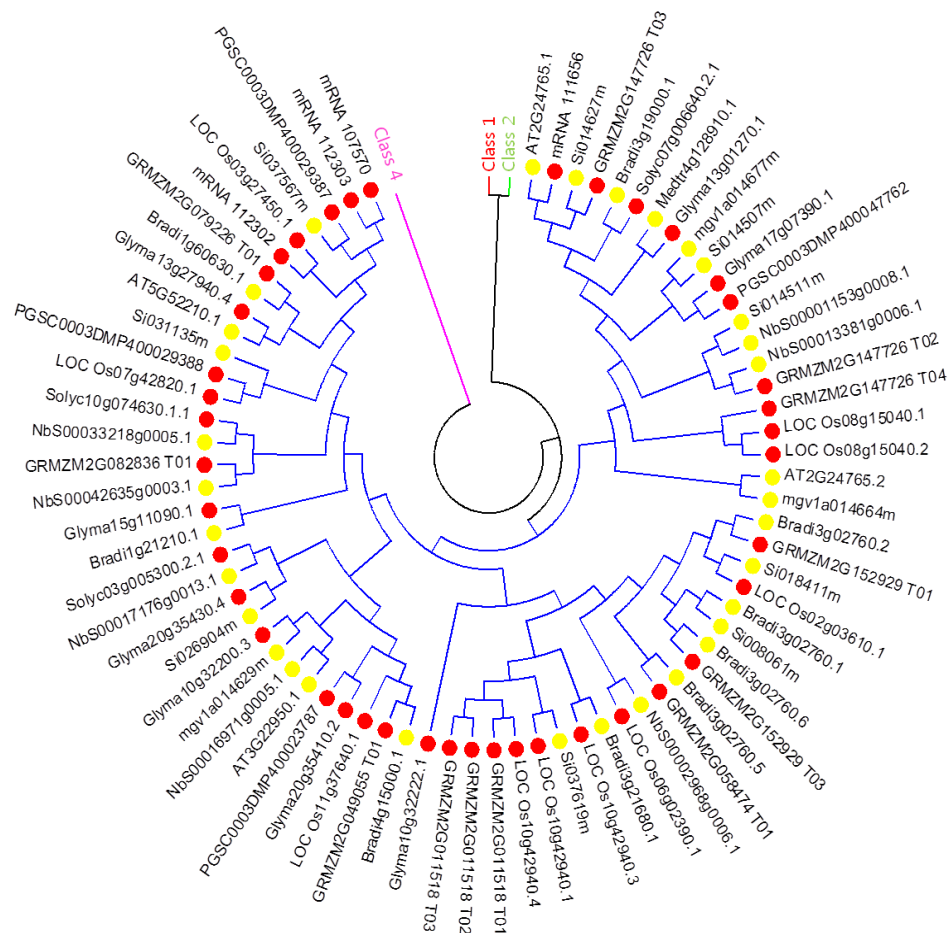


그림 33. 야생 식물과 작물들의 ARF family protein의 unrooted 계통수에서 Class 3에 포함되는 ARF family protein.

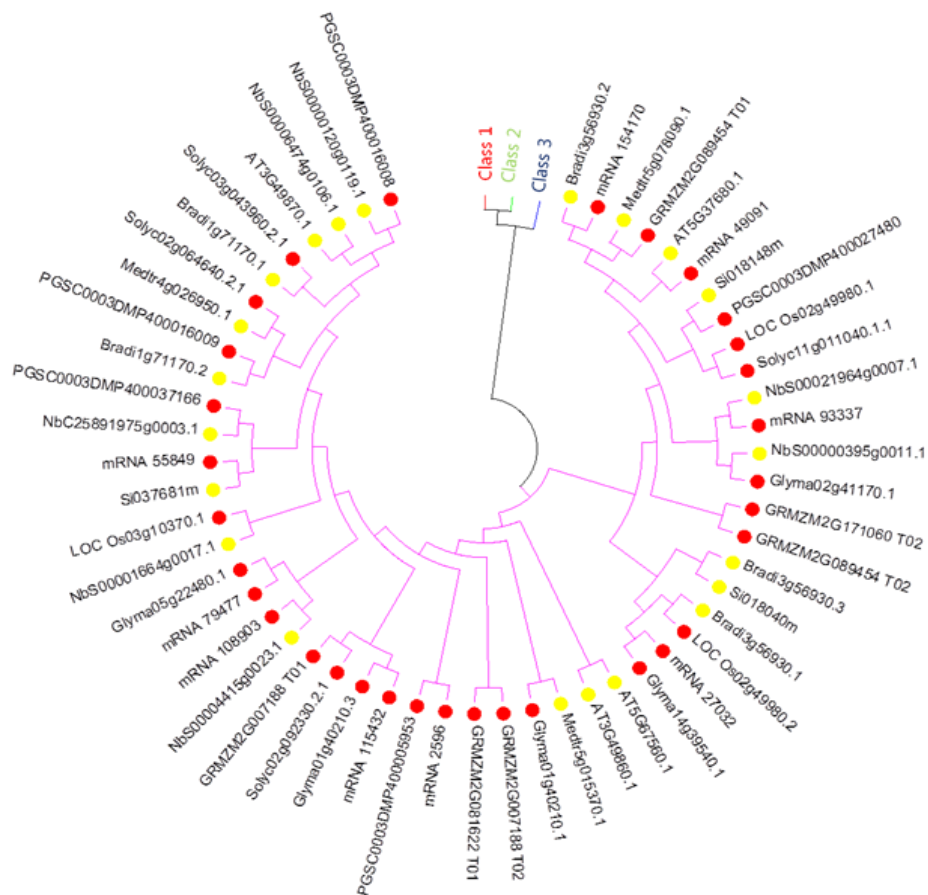
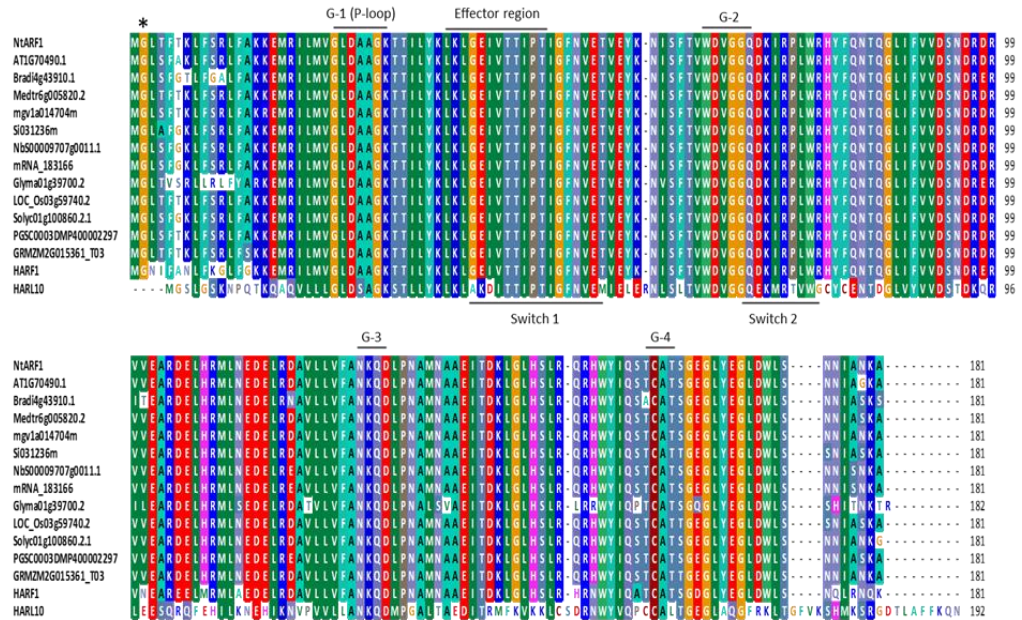
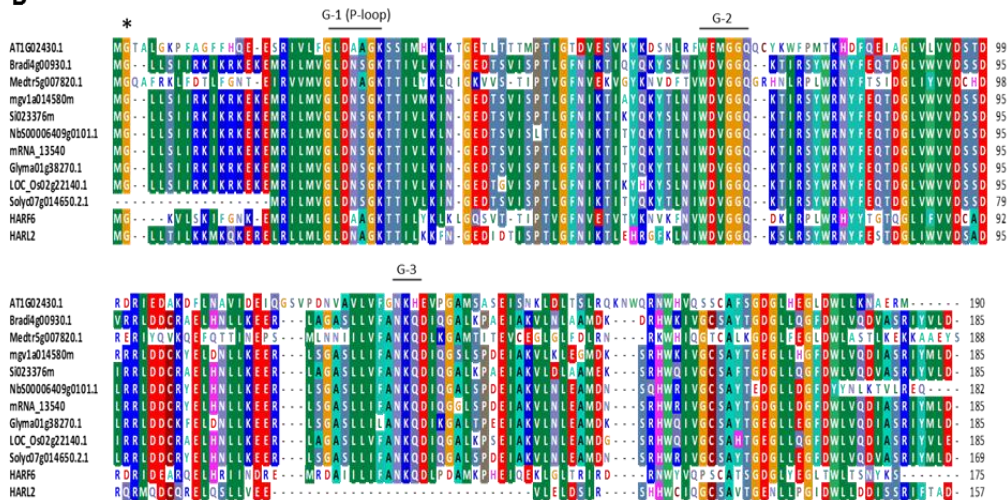


그림 34. 야생 식물과 작물들의 ARF family protein의 unrooted 계통수에서 Class 4에 포함되는 ARF family protein.

**A**



**B**





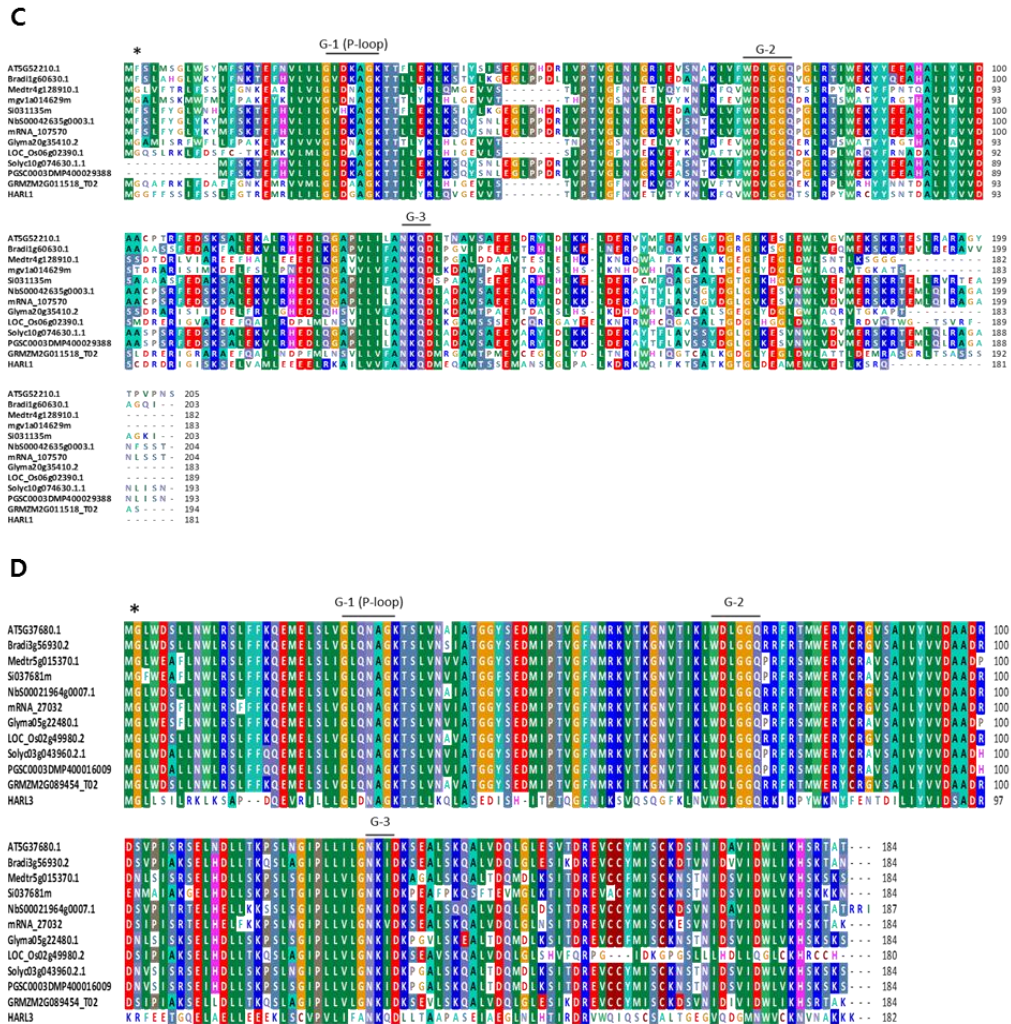
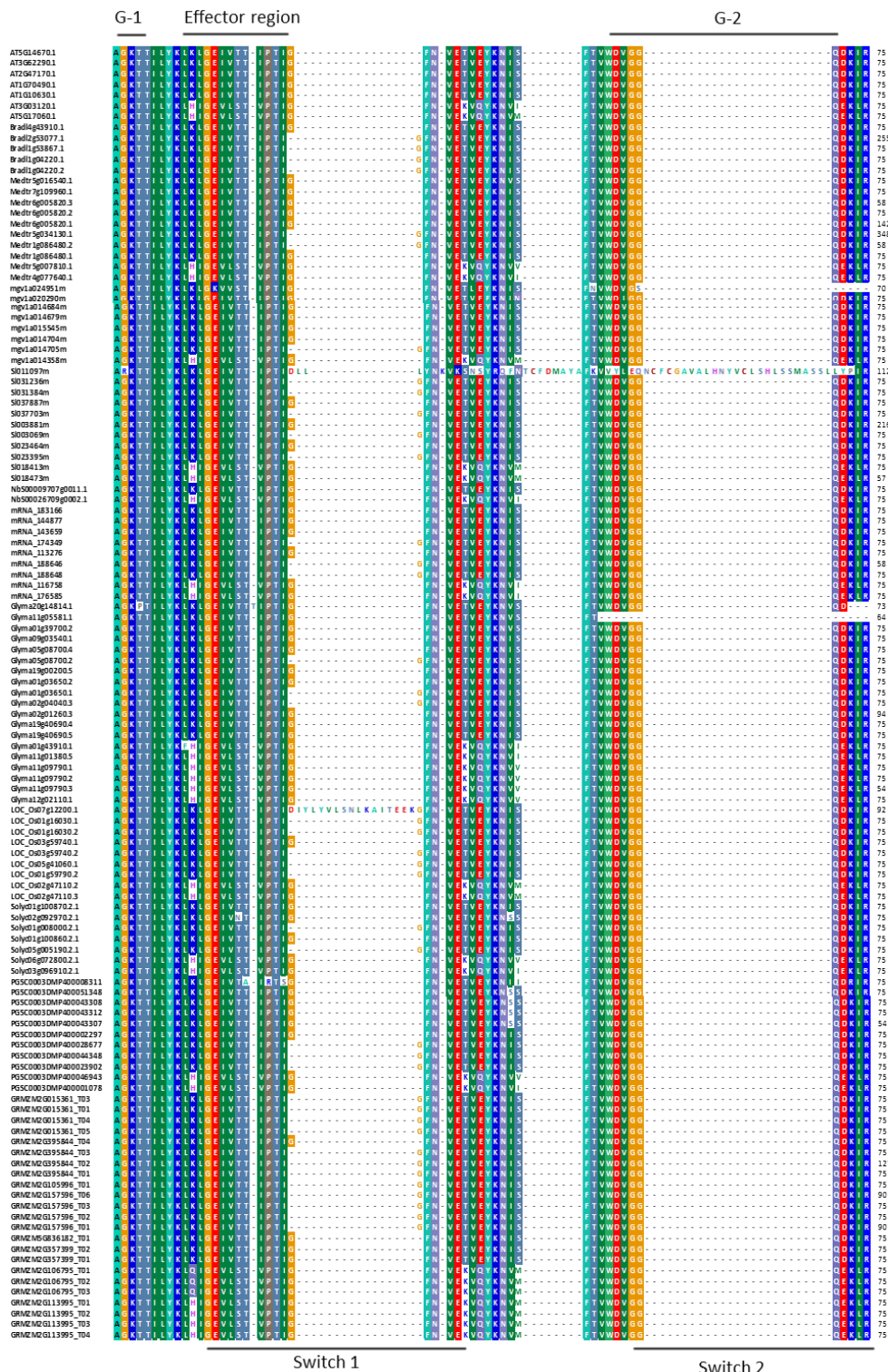


그림 35. 야생식물 및 작물들에서 선별된 대표 ARF의 아미노산 서열 분석 결과. Myristoylation site는 star로 표시하였고 GTP-binding motif에 의해 구성된 4개의 domain (G1-G4), 두 개의 GEF Sec7 interaction domain (switch 1 and 2), 한 개의 GAP interaction domain (effector region)은 선으로 표시하였다. A) Class 1에 포함되는 ARF들의 아미노산 서열 분석 결과. B) Class 2에 포함되는 ARF들의 아미노산 서열 분석 결과. C) Class 3에 포함되는 ARF들의 아미노산 서열 분석 결과. D) Class 4에 포함되는 ARF들의 아미노산 서열 분석 결과.

[illegible]





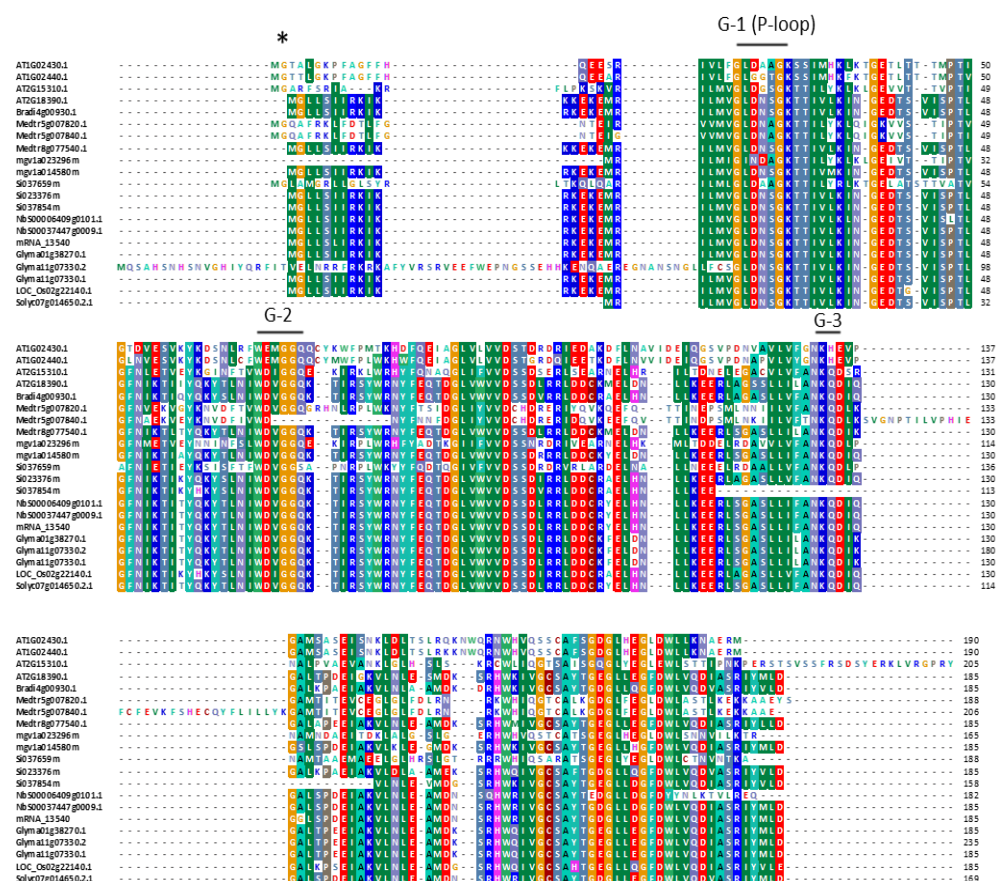
G-3

1 3 0

## G-4

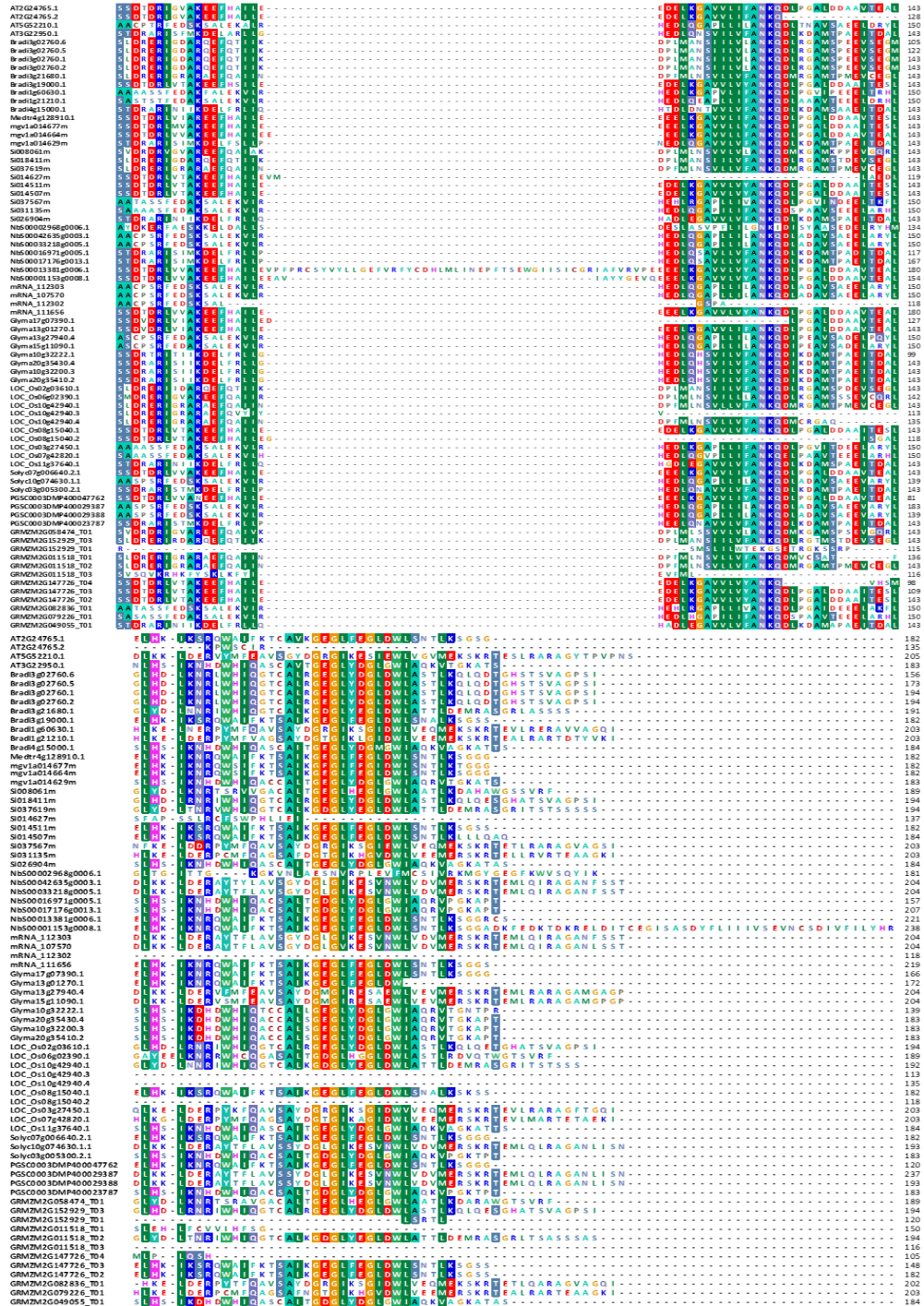
[illegible]

B

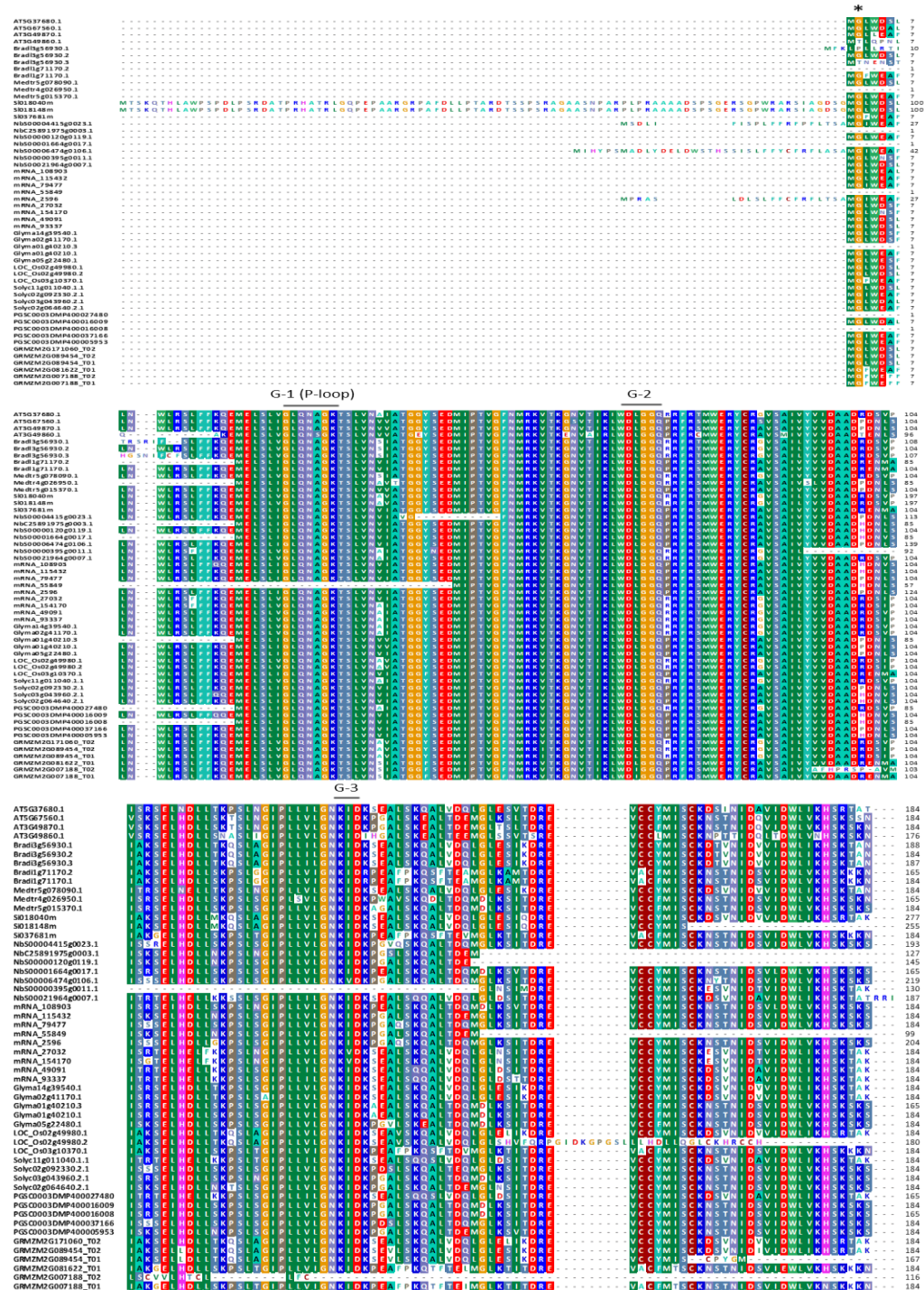








D



**그림 36.** 야생식물 및 작물들의 ARF 아미노산 서열 분석 결과. Myristoylation site는 star로 표시하였고 GTP-binding motif에 의해 구성된 4개의 domain (G1-G4), 두 개의 GEF Sec7 interaction domain (switch 1 and 2), 한 개의 GAP interaction domain (effector region)은 선으로 표시하였다. A) Class 1에 포함되는 ARF들의 아미노산 서열 분석 결과. B) Class 2에 포함되는 ARF들의 아미노산 서열 분석 결과. C) Class 3에 포함되는 ARF들의 아미노산 서열 분석 결과. D) Class 4에 포함되는 ARF들의 아미노산 서열 분석 결과.



GTP-binding motif에 의해 구성된 3개의 domain과 N-말단에 미리스토일화 site가 존재하지만 GEF Sec7 interaction domain (switch 1 and 2)과 GAP interaction domain는 존재하지 않는 것을 알 수 있었다(그림 35, 36).

#### 야생식물과 작물들에서의 ARF gene family의 비교

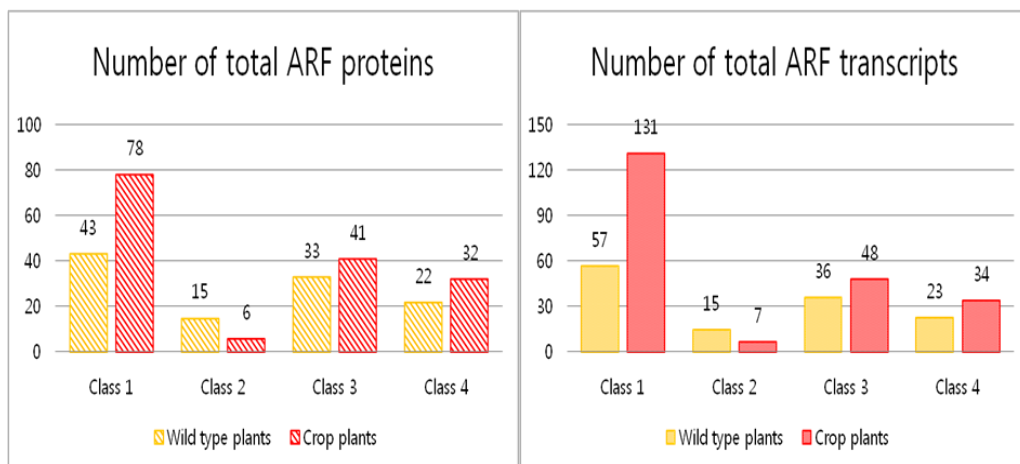
ARF member는 *A. thaliana*, *B. distachyon*, *M. truncatula*, *S. italica*, *N. benthamiana*, *M. guttatus*에서 각각 19, 20, 17, 26, 18, 13개의 ARF family protein을 갖고 있으며 *O. sativa*, *G. max*, *Z. mays*, *N. tabacum* cv TN90, *S. tuberosum*, *S. lycopersicum*에서는 각각 23, 35, 41, 23, 20, 15개의 ARF family protein을 갖고 있었다(표 6). 계통발생학적 분류를 통해 4개의 class로 분류한 ARF family protein은, 43개의 Class 1 ARF가 야생 식물중에 존재하였고 73개의 Class 1 ARF가 작물들에 존재하였다. 나머지 Class2, 3, 4에 포함된 ARF는 야생 식물중이 70개, 작물중이 79개였다.

ARF family protein을 비교한 것과 마찬가지로 야생 식물과 작물들에서 ARF family gene transcript를 비교하였을 때 57개의 야생 식물의 ARF transcript가 Class 1에 포함되었고 131개의 작물의 ARF transcript가 Class 1에 포함되었다. 나머지 Class2, 3, 4에 포함되는 ARF transcript의 수는 야생 식물중이 74개, 작물들이 89개 존재하는 것이 확인되어 이 결과에서 Class 1 ARF가 작물 중에서 높은 비율을 갖고 있는 것이 확인 되었고 또한 Class 1 ARF는 다른 Class와는 다르게 전사물의 양이 증가한 것이 확인 되었으며 이러한 현상은 야생 식물과 비교하였을 때 작물들에서 더 뚜렷하게 나타났다(그림 37).



표 6. 계통수 분석에 의하여 분리된 야생식물과 작물들의 ARF family protein과 ARF family gene transcript의 비교

	Class 1		Class 2		Class 3		Class 4		Total	
	Proteins	Transcripts	Proteins	Transcripts	Proteins	Transcripts	Proteins	Transcripts	Proteins	Transcripts
<i>Arabidopsis thaliana</i>	7(36.84%)	12(46%)	4(21%)	4(15.3%)	4(21%)	6(23%)	4(21%)	4(15.3%)	19	26
<i>Brachypodium distachyon</i>	5(25%)	5(25%)	1(5%)	1(5%)	9(45%)	9(45%)	5(25%)	5(25%)	20	20
<i>Medicago truncatula</i>	10(58.8%)	10(58.8%)	3(17.6%)	3(17.6%)	1(5.8%)	1(5.8%)	3(17.6%)	3(17.6%)	17	17
<i>Setaria italica</i>	11(42.3%)	16(51.6%)	3(11.5%)	3(9.6%)	9(34.6%)	9(29%)	3(11.5%)	3(9.6%)	26	31
<i>Nicotiana benthamiana</i>	2(11.1%)	2(10.5%)	2(11.1%)	2(10.5%)	7(38.8%)	7(36.8%)	7(38.8%)	8(42.1%)	18	19
<i>Mimulus guttatus</i>	8(61.5%)	12(66.6%)	2(15.3%)	2(11%)	3(23%)	4(22.2%)	0(0%)	0(0%)	13	18
<b>Wild type plants</b>	<b>43(38%)</b>	<b>57(43.51%)</b>	<b>15(13.27%)</b>	<b>15(11.45%)</b>	<b>33(29.2%)</b>	<b>36(27.48%)</b>	<b>22(19.46%)</b>	<b>23(17.55%)</b>	<b>113</b>	<b>131</b>
<i>Oryza sativa</i>	9(39%)	15(51.7%)	1(4.3%)	1(3.4%)	10(43.4%)	10(34.3%)	3(13%)	3(10.3%)	23	29
<i>Glycine max</i>	19(54.2%)	39(65%)	3(8.5%)	3(5%)	8(22.8%)	13(21.6%)	5(14.2%)	5(8.3%)	35	60
<i>Zea mays</i>	23(56%)	27(58.6%)	0(0%)	0(0%)	12(29%)	13(28.2%)	6(14.6%)	6(13%)	41	46
<i>Nicotiana tabacum</i> (TN90)	9(39%)	19(51.3%)	1(4.34%)	2(5.4%)	4(17.3%)	5(13.5%)	9(39.1%)	11(29.7%)	23	37
<i>Solanum tuberosum</i>	11(55%)	24(72.7%)	0(0%)	0(0%)	4(20%)	4(12.1%)	5(25%)	5(15.1%)	20	33
<i>Solanum lycopersicum</i>	7(46.6%)	7(46.6%)	1(6.6%)	1(6.6%)	3(20%)	3(20%)	4(26.6%)	4(26.6%)	15	15
<b>Crop plants</b>	<b>78(49.68%)</b>	<b>131(59.54%)</b>	<b>6(3.82%)</b>	<b>7(3.18%)</b>	<b>41(26.11%)</b>	<b>48(21.81%)</b>	<b>32(20.38%)</b>	<b>34(15.45%)</b>	<b>157</b>	<b>220</b>



**그림 37.** 야생식물과 작물들의 ARF family protein과 ARF family gene transcript의 비교결과. Class 1 ARF protein 및 ARF transcript는 야생 식물 및 작물에서 모두 다른 class보다 많이 존재 한다. 특히 작물에는 야생 식물들과 비교하여 더 많은 수의 Class 1 ARF protein와 ARF transcript가 존재 한다.

표 7. 야생식물과 작물들의 배수성, coding gene, genome size, 염색체 개수

Species	Ploidy	Coding genes	genome size	Chromosome number
<i>Arabidopsis thaliana</i>	diploid	27,416	135 Mbp	5
<i>Mimulus guttatus</i>	diploid	26,718	about 430 Mbp	14
<i>Brachypodium distachyon</i>	diploid	26,552	355 Mbp	5
<i>Oryza sativa</i>	diploid	35,679	about 400Mbp	12
<i>Medicago truncatula</i>	diploid	44,115	374 Mbp	8
<i>Glycine max</i>	diploid	54,174	1,115 Mbp	20
<i>Setaria italica</i>	diploid	35,471	490 Mbp	9
<i>Zea mays</i>	diploid	39,469	2.4GB	10
<i>Nicotiana benthamiana</i>	diploid	N/A	N/A	19
<i>Nicotiana tabacum</i> (TN90)	allotetraploid	N/A	N/A	12
<i>Solanum tuberosum</i>	tetraploid	35,119	840 Mbp	12
<i>Solanum lycopersicum</i>	diploid	34,675	950 Mbp	12

## 고찰

ARF는 yeast, mammalian 그리고 여러 종의 식물들에 높은 수준으로 보존되어 있으며, human에서는 ARF와 ARL로 크게 분류되었고 ARF는 3개의 Class로 분류된다(D' Souza-Schorey and Chavrier, 2006; Nakai et al., 2013). 본 연구에서 12종의 야생 식물 및 작물들의 public database에서 270개의 ARF를 선별한 뒤, 계통학적 분류법을 활용하여 4개의 class로 분류하였다. 분류한 Class 1과 Class 2에는 ARF로 명명된 ARF family protein들이 포함되었으며 본 연구에서 분리한 9개의 NtARF는 Class 1에 포함되었다. Class 3과 Class 4에는 ARL로 명명된 ARF family protein들이 포함되었다. Human의 ARF Class 1, 2는 본 연구 결과에서 분류한 Class 1에 포함되었고 human ARF Class 3는 본 연구결과에서 분류한 Class 2와 유사성이 높았다. 나머지 human ARL들은 Class 3과 4에 포함 되는 것이 확인되었다. 계통학적 분류에 의해 4개의 class로 분류된 ARF의 분류는 최근에 보고된 애기장대, 벼, 조의 ARF들을 분류한 결과와 매우 흡사하였다(Muthamilarasan et al., 2016).

계통학적 분류를 통해 얻은 결과에서 4개의 class 중 Class 1에 가장 많은 수의 ARF family protein들이 포함되며 이것은 다른 class와 비교하여 뚜렷한 차이를 보여주었다. 또한 야생 식물들에서 보다 작물에서 이러한 현상이 더 분명하였고, 야생 식물과 작물들의 차이는 ARF family gene transcript의 수를 비교하였을 때 더욱더 분명해 졌다. 작물에서 ARF family gene transcript 수의 증가는 대부분이 5' UTR 또는 3' UTR의 차이에 의하여 이루어 졌으며 작물의 Class 1에서 총 131개의 ARF family gene

transcript 중에 88.6%인 116개의 ARF transcript는 5' UTR 또는 3' UTR이 차이가 있지만 동일한 단백질을 coding하였고 나머지 15개의 ARF transcript는 서로 다른 ORF를 갖지만 동일한 단백질을 coding하는 경우였다. 몇몇 야생 식물과 작물은 상당히 차이가 있지만 그래도 여전히 계통 발생적으로 관련이 있다. *B. distachyon* 와 *O. sativa*, *M. truncatula* 와 *G. max*, *S. italica* 와 *Z. mays*, *N. benthamiana* 와 *N. tabacum* cv. TN90, *M. guttatus* 와 *S. tuberosum*를 비교하였을 때 작물에서 전체적으로 유전자 수의 증가를 확인 할 수 있다. 예를 들어 *B. distachyon*에는 26,500개의 유전자가 *O. sativa*에는 35,700개의 유전자가 존재하며 *M. truncatula*에는 44,100개의 유전자가 *G. max*에는 54,200개의 유전자가 존재하고 *S. italica* 과 *Z. mays*에는 각각 35,500개와 39,500의 유전자가 존재한다(표 7). 각각의 작물들의 야생식물들 보다 증가된 유전자수를 고려하더라도, Class 1 ARF들은 작물에서 78개가 존재하고 야생식물들에서 43개가 존재하며, Class 1 ARF 전사물은 작물에서 131개가 존재하고 야생식물들에서 57개가 존재 하므로, 작물에서 Class 1 ARF의 뚜렷한 증가를 확인 할 수 있으며 이러한 현상은 다른 class들보다 Class 1에서 많이 집중 되었다. 이러한 결과는 야생 식물들과 비교하여 작물의 유전자 수 증가에 의해 Class 1 ARF가 작물에서 증가하였다면 다른 class 역시 작물에서 비슷한 증가를 보였어야 된다고 예상 한다. 하지만 Class 1 ARF 만이 작물에서 뚜렷한 증가를 보이고 다른 class에서 확인 되지 않으므로 이러한 현상이 작물의 생산성을 증가시키기 위한 품종 개량과정에서 발생하는 현상이라고 생각된다. 여러 작물들은 작물의 질과 생산성을 높이기 위한 방식으로 많은 품종 개량이 이루어져 왔다. 더 우수한 형질을 갖는 식물을 교배하여 얻는 품종 개량은 가장 전통적인 방식으로 이용되어 왔고, 이러한 과정 속에서 활발한 품종 개량이 이루어진 주요 작물

들의 식물체 내에서 유전적 변화가 발생하여 작물 식물체내의 특정 유전자의 축적이 발생했을 것이라 추측한다. 그 예로, 많은 수의 Class 1 ARF family protein과 ARF family transcript가 주요 작물들에서 축적되었다고 예상한다. 우수한 품종 개량과정에서 축적된 ARF를 분자생물학적 방식을 이용하여 직접적으로 식물의 품종 개량에 이용한다면 기존의 방식과 비교하여 좀더 효율적인 품종 개량 결과를 얻을 수 있을 것으로 예상 한다.

## 결론

식물은 다양한 비생물 스트레스에 노출되어 생존해야 된다. 비생물 스트레스는 식물의 생장과 발달뿐만 아니라 작물의 질과 생산성에 부정적인 영향을 미치게 된다. 그렇기 때문에 비생물 스트레스에 저항을 갖는 작물을 개발하기 위하여, 비생물 스트레스에서 식물체내에 일어나는 유전자 수준의 반응을 연구하는 것은 매우 중요하다. 비생물 스트레스에서는 다양한 유전자의 발현이 유도되고 *CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1* 또한 다양한 비생물 스트레스에 의해 발현이 유도되는 유전자이다. 다양한 비생물 스트레스 조건하에 3개의 유전자가 강하게 발현이 유도되어 비생물 스트레스에 기능을 가질 것이라 예측 하였지만 3개의 유전자를 과다발현 시킨 각각의 형질전환 식물체들은 비생물 스트레스에 내성을 보이지 않았다. 3종의 형질전환 식물체의 전사체 분석결과에서, 이들 유전자들에 의해 발현이 상향조절된 다양한 하위유전자중에 공통적으로 상향조절이 되는 *NtARF1*을 확인 할 수 있었고, *NtARF1*은 고온 스트레스에서 직접적으로 발현이 유도되는 것을 확인 하였다. *NtARF1*을 과다발현 시킨 형질전환체 담배는 대조군 식물체와 비교하여 일반적인 성장 환경에서 형태적 차이를 보이며 생체량 비교결과에서도 대조군 식물체와 비교하여 뚜렷한 통계적 증가를 보였다. *CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1* 형질전환 식물체의 비생물 스트레스 내성 결과와는 다르게 동일한 조건의 고온, 건조, 저온, 고염스트레스에서 *NtARF1* 형질전환체 담배는 대조군 식물체보다 증가된 생장률에 의해 비생물 스트레스 내성의 증가를 확인할 수 있었다. 또한 *NtARF1*의 과다발현은 형질전환 식물체의 종자들을 빠르게 발아시키는 것을 확인 할 수 있었다. *NtARF1*은 다양한 비생물 스트레스에 반응 하는 *CaPP2C*, *CaMAPK1*, *CaBI-1*의 공통 하위 유전자로서, 식물의 생장에 관련된 유전자들의 발현을 조절하여 대조군 식물체와 비교해 높은 생

장률을 보이고 이를 바탕으로 비생물 스트레스에 대한 내성도 향상 된다고 예상한다. 또한 유전체 분석이 완료된 주요 작물과 야생식물들에서의 ARF를 분류한 결과, 분류한 4개의 class중 NtARF1이 포함되는 Class1 ARF는 다른 class와 비교하여 야생식물과 작물들에서 더 많이 존재 하였으며, Class 1 ARF는 다른 class와는 다르게 ARF family transcript 양이 증가한 것이 확인 되었으며, 이러한 현상은 야생 식물과 비교하였을 때 작물들에서 더 뚜렷하게 나타났다. 이 결과에서 작물의 질과 생산성을 증가시키기 위한 품종 개량에서, Class 1 ARF가 작물의 품질개량에 중요한 역할을 하여 야생 식물들과 비교하여 더 많은 수의 Class 1 ARF가 작물에 존재하는 것이라 예상된다. 그러므로 Class 1에 포함되는 NtARF1은 다양한 비생물 스트레스에 대한 내성 증가에 기능을 하므로 NtARF1을 활용하면 기존의 품종 개량 방식보다 효율적으로 작물의 품종개량이 가능 할 것으로 예상된다.



## 참고 문헌

- Alzwy IA, Morris PC** (2007) A mutation in the Arabidopsis MAP kinase kinase 9 gene results in enhanced seedling stress tolerance. *Plant Sci* **173**: 302-308
- Atkinson NJ, Urwin PE** (2012) The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *J Exp Bot* **63**: 3523–3543
- Benešová M, Holá D, Fischer L, Jedelský PL, Hnilička F, Wilhelmová N, Rothová O, Kočová M, Procházková D, Honnerová J, Fridrichová L, Hniličková H** (2012) The physiology and proteomics of drought tolerance in maize: early stomatal closure as a cause of lower tolerance to short-term dehydration? *PLoS One* **7**: e38017
- Bigeard J, Colcombet J, Hirt H** (2015) Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Mol Plant* **8**: 521–539
- Brown JK** (1994) Bootstrap hypothesis tests for evolutionary trees and other dendrograms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 12293-12297
- Cheng MC, Liao PM, Kuo WW, Lin TP** (2013) The Arabidopsis ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 regulates abiotic stress-responsive gene expression by binding to different cis-acting elements in response to different stress signals. *Plant Physiol* **162**: 1566–1582
- Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu JK** (2004) Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J Exp Bot* **55**: 395
- Colcombet J, Hirt H** (2008) *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem J* **413**: 217–226

**Craig EA, Huang P, Aron R, Andrew A** (2006) The diverse roles of J-proteins, the obligate Hsp70 co-chaperone. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **156**: 1-21

**Donaldson JG, Jackson CL** (2011) ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 362-375

**D'Souza-Schorey C, Chavrier P** (2006) ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 347-358

**Felsenstein J** (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* **17**: 368-376

**Fu H, Doelling JH, Rubin DM, Vierstra RD** (1999) Structural and functional analysis of the six regulatory particle triple-A ATPase subunits from the *Arabidopsis* 26S proteasome. *Plant J* **18**: 529–539

**Fuchs S, Grill E, Meskiene I, Schweighofer A** (2013) Type 2C protein phosphatases in plants. *FEBS J* **280**: 681-693

**Gao L, Xiang CB** (2008) The genetic locus At1g73660 encodes a putative MAPKKK and negatively regulates salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **67**: 125-134

**Gebbie LK, Burn JE, Hocart CH, Williamson RE** (2005) Genes encoding ADP-ribosylation factors in *Arabidopsis thaliana* L. Heyn.; genome analysis and antisense suppression. *J Exp Bot* **56**: 1079-1091

**Han Y, Cao H, Jiang J, Xu Y, Du J, Wang X, Yuan M, Wang Z, Xu Z, Chong K** (2008) Rice ROOT ARCHITECTURE ASSOCIATED1 binds the proteasome subunit RPT4 and is degraded in a D-box and proteasome-dependent manner. *Plant Physiol*

**148:** 843-855

**Hasanuzzaman M, Nahar K, Alam MM, Roychowdhury R, Fujita M** (2013) Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *Int J Mol Sci* **14**: 9643–9684

**Hirayama T, Umezawa T** (2010) The PP2C-SnRK2 complex: the central regulator of an abscisic acid signaling pathway. *Plant Signal Behav* **5**: 160-163

**Hoang MH, Nguyen XC, Lee K, Kwon YS, Pham HT, Park HC, Yun DJ, Lim CO, Chung WS** (2012) Phosphorylation by AtMPK6 is required for the biological function of AtMYB41 in Arabidopsis. *Biochem Biophys Res Commun* **422**: 181–186

**Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT** (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**: 1229-1231

**Huang B, Xu C** (2008) Identification and characterization of proteins associated with plant tolerance to heat stress. *J Integr Plant Biol* **50**:1230–1237

**Hückelhoven R** (2004) BAX Inhibitor-1, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives. *Apoptosis* **9**: 299–307

**Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C, Heberle-Bors E, Ellis BE, Morris PC, Innes RW, Ecker JR, Scheel D, Klessig DF, Machida Y, Mundy J, Ohashi Y, Walker JC** (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci* **7**: 301-308

**Ichimura T, Wakamiya-Tsuruta A, Itagaki C, Taoka M, Hayano T, Natsume T, Isobe T** (2002) Phosphorylation-dependent interaction of kinesin light chain 2 and the 14-3-3 protein. *Biochemistry* **41**: 5566–5572

**Isbat M, Zeba N, Kim SR, Hong CB** (2009) A BAX inhibitor-1 gene in *Capsicum annuum* is induced under various abiotic stresses and endows multi-tolerance in transgenic tobacco. *J Plant Physiol* **166**: 1685-1693

**Kerk D, Bulgrien J, Smith DW, Barsam B, Veretnik S, Gribskov M** (2002) The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **129**: 908-925

**Kim SY, Zhu T, Sung ZR** (2010) Epigenetic regulation of gene programs by EMF1 and EMF2 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **152**: 516-528

**Kissoudis C, van de Wiel C, Visser RG, van der Linden G** (2014) Enhancing crop resilience to combined abiotic and biotic stress through the dissection of physiological and molecular crosstalk. *Front Plant Sci* **5**: 207

**Koo HJ, Park SM, Kim KP, Suh MC, Lee MO, Lee SK, Xinli X, Hong CB** (2015) Small heat shock proteins can release light dependence of tobacco seed during germination. *Plant Physiol* **167**: 1030-1038

**Lee SK, Kim BG, Kwon TR, Jeong MJ, Park SR, Lee JW, Byun MO, Kwon HB, Matthews BF, Hong CB, Park SC** (2011) Overexpression of the mitogen-activated protein kinase gene OsMAPK33 enhances sensitivity to salt stress in rice (*Oryza sativa* L.). *J Biosci* **36**: 139-151

**Lee MC, Orci L, Hamamoto S, Futai E, Ravazzola M, Schekman R** (2005) Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell* **122**: 605-617

**Li B, Yadav RK, Jeong GS, Kim HR, Chae HJ** (2014) The characteristics of Bax inhibitor-1 and its related diseases. **14**: 603-615

- Li P, Cao W, Fang H, Xu S, Yin S, Zhang Y, Lin D, Wang J, Chen Y, Xu C, Yang Z** (2017) Transcriptomic Profiling of the Maize (*Zea mays* L.) Leaf Response to Abiotic Stresses at the Seedling Stage. *Front Plant Sci* **8**: 290
- Lippold F, Sanchez DH, Musialak M, Schlereth A, Scheible WR, Hinch DK, Udvardi MK** (2009) AtMyb41 regulates transcriptional and metabolic responses to osmotic stress in Arabidopsis. *Plant Physiol* **149**: 1761-1772
- Liscovitch M, Czarny M, Fiucci G, Tang X** (2000) Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem J* **345**: 401-415.
- Moss J, Vaughan M** (1998) Molecules in the ARF orbit. *J Biol Chem* **273**: 21431-21434
- Moustafa K, AbuQamar S, Jarrar M, Al-Rajab AJ, Trémouillaux-Guiller J** (2014) MAPK cascades and major abiotic stresses. *Plant Cell Rep* **33**: 1217-1225
- Muthamilarasan M, Mangu VR, Zandkarimi H, Prasad M, Baisakh N** (2016) Structure, organization and evolution of ADP-ribosylation factors in rice and foxtail millet, and their expression in rice. *Sci Rep* **6**: 24008
- Nakai W, Kondo Y, Saitoh A, Naito T, Nakayama K, Shin HW** (2013) ARF1 and ARF4 regulate recycling endosomal morphology and retrograde transport from endosomes to the Golgi apparatus. *Mol Biol Cell* **24**: 2570-2581
- Naramoto S, Kleine-Vehn J, Robert S, Fujimoto M, Dainobu T, Paciorek T, Ueda T, Nakano A, Van Montagu MC, Fukuda H, Friml J** (2010) ADP-ribosylation factor machinery mediates endocytosis in plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 21890-21895

**Neill S, Desikan R, Hancock J** (2002) Hydrogen peroxide signalling. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 388–395

**Ni FT, Chu LY, Shao HB, Liu ZH** (2009) Gene expression and regulation of higher plants under soil water stress. *Curr Genomics* **10**: 269-280

**Popescu SC, Popescu GV, Bachan S, Zhang Z, Gerstein M, Snyder M, Dinesh-Kumar SP** (2009) MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes Dev* **23**: 80–92

**Renault L, Guibert B, Cherfils J** (2003) Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor. *Nature* **426**: 525-530

**Richards E, Reichardt M, Rogers S** (2001) Preparation of genomic DNA from plant tissue. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (ed) *Current protocols molecular biology*. Wiley, New York

**Robinson KS, Clements A, Williams AC, Berger CN, Frankel G** (2011) Bax inhibitor 1 in apoptosis and disease. *Oncogene* **30**: 2391–2400

**Sah SK, Reddy KR, Li J** (2016) Absciscic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Front Plant Sci* **7**: 571

**Sambrook J, Russell D** (3<sup>rd</sup> eds) (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

**Sanchez P, de Torres Zabala M, Grant M** (2000) AtBI-1, a plant homologue of Bax inhibitor-1, suppresses Bax-induced cell death in yeast and is rapidly upregulated during wounding and pathogen challenge. *Plant J* **21**: 393-399

**Schweighofer A, Hirt H, Meskiene I** (2004) Plant PP2C phosphatases: emerging

functions in stress signaling. *Trends Plant Sci* **9**: 236-243

**Schweighofer A, Meskiene I** (2008) Protein phosphatases in plant growth signaling pathways. In: Boegre L, Beemster G (ed) *Plant Cell Monograph*. Springer, Berlin

**Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K** (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J* **32**: 279-292

**Sham A, Moustafa K, Al-Ameri S, Al-Azzawi A, Iratni R, AbuQamar S** (2015) Identification of Arabidopsis candidate genes in response to biotic and abiotic stresses using comparative microarrays. *PLoS ONE* **10**: e0125666

**Sheard LB, Zheng N** (2013) Plant biology: Signal advance for abscisic acid. *Nature* **462**: 575-576

**Shibahara T, Kawasaki H, Hirano H** (2002) Identification of the 19S regulatory particle subunits from the rice 26S proteasome. *Eur J Biochem* **269**: 1474–1483

**Shin HW, Nakayama K** (2004) Guanine nucleotide-exchange factors for arf GTPases: their diverse functions in membrane traffic. *J Biochem* **136**: 761-767

**Shimada H, Ohno R, Shibata M, Ikegami I, Onai K, Ohto MA, Takamiya K** (2005) Inactivation and deficiency of core proteins of photosystems I and II caused by genetical phyloquinone and plastoquinone deficiency but retained lamellar structure in a T-DNA mutant of Arabidopsis. *Plant J* **41**: 627-637

**Shimizu T, Yoshii A, Sakurai K, Hamada K, Yamaji Y, Suzuki M, Namba S, Hibi T** (2009) Identification of a novel tobacco DnaJ-like protein that interacts with the

movement protein of tobacco mosaic virus. Arch Virol **154**: 959-967

**Singh A, Giri J, Kapoor S, Tyagi AK, Pandey GK** (2010) Protein phosphatase complement in rice: genome- wide identification and transcriptional analysis under abiotic stress conditions and reproductive development. BMC Genomics **11**: 435

**Singh A, Pandey A, Srivastava AK, Tran LP, Pandey GK** (2016) Plant protein phosphatases 2C: from genomic diversity to functional multiplicity and importance in stress management. Crit Rev Biotechnol **36**: 1023-1035

**Singh D, Laxmi A** (2015) Transcriptional regulation of drought response: a tortuous network of transcriptional factors. Front Plant Sci **6**: 895

**Skirycz A, Inzé D** (2010) More from less: plant growth under limited water. Curr Opin Biotechnol **21**: 197-203

**Spartz AK, Ren H, Park MY, Grandt KN, Lee SH, Murphy AS, Sussman MR, Overvoorde PJ, Gray WM** (2014) SAUR Inhibition of PP2C-D Phosphatases Activates Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPases to Promote Cell Expansion in Arabidopsis. Plant Cell **26**: 2129-2142

**Suh MC, Hong CB, Kim SS, Sim WS** (1994) Transgenic tobacco plants with Bacillus thuringiensis delta-endotoxin gene resistant to Korean-born tobacco budworms. Mol Cells **4**: 211-219

**Sun L, Wang YP, Chen P, Ren J, Ji K, Li Q, Li P, Dai SJ, Leng P** (2011) Transcriptional regulation of SIPYL, SIPP2C, and SLSnRK2 gene families encoding ABA signalcore components during tomato fruit development and drought stress. J Exp Bot **62**: 5659-5669



**Sun Y, Zhou X, Ma H** (2007) Genome-wide Analysis of Kelch Repeat-containing F-box Family. *J Integr Plant Biol* **49**: 640-952

**Taj G, Agarwal P, Grant M, Kumar A** (2010) MAPK machinery in plants: recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways. *Plant Signal Behav* **5**: 1370–1378

**Takahashi D, Li B, Nakayama T, Kawamura Y, Uemura M** (2013) Plant plasma membrane proteomics for improving cold tolerance. *Front Plant Sci* **4**: 90

**Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S** (2013) MEGA6.0: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**: 2725-2729

**Vernoud V, Horton AC, Yang Z, Nielsen E** (2003) Analysis of the small GTPase gene superfamily of Arabidopsis. *Plant Physiol* **131**: 1191-1208

**Tovar-Mendez A, Miernyk JA, Hoyos E, Randall DD** (2014) A functional genomic analysis of Arabidopsis thaliana PP2C clade D. *Protoplasma* **251**: 265-271

**Wang H, Wang H, Shao H, Tang X** (2016) Recent Advances in Utilizing Transcription Factors to Improve Plant Abiotic Stress Tolerance by Transgenic Technology. *Front Plant Sci* **7**: 67

**Wang Q, Xue X, Li Y, Dong Y, Zhang L, Zhou Q, Deng F, Ma Z, Qiao D, Hu C, Ren Y** (2016) A maize ADP-ribosylation factor ZmArf2 increases organ and seed size by promoting cell expansion in Arabidopsis. *Physiol Plant* **156**: 97-107

**Watanabe N, Lam E** (2004) Recent advance in the study of caspase-like proteases and Bax inhibitor-1 in plants: their possible roles as regulator of programmed cell death. *Mol Plant Pathol* **5**: 65-70

**Watanabe N, Lam E** (2009) Bax Inhibitor-1, a conserved cell death suppressor, is a key molecular switch downstream from a variety of biotic and abiotic stress signals in plants. *Int J Mol Sci* **10**: 3149–3167

**Watanabe N, Lam E** (2008) BAX inhibitor-1 modulates endoplasmic reticulum stress-mediated programmed cell death in Arabidopsis. *J Biol Chem* **283**: 3200–3210

**Wei K, Pan S** (2014) Maize protein phosphatase gene family: identification and molecular characterization. *BMC Genomics* **15**: 773

**Xiong JS, Ding J, Li Y** (2015) Genome-editing technologies and their potential application in horticultural crop breeding. *Hortic Res* **2**: 15019

**Xu J, Chua NH** (2012) Dehydration stress activates Arabidopsis MPK6 to signal DCP1 phosphorylation. *EMBO J* **31**: 1975–1984

**Xu J, Scheres B** (2005) Dissection of Arabidopsis ADP-RIBOSYLATION FACTOR 1 function in epidermal cell polarity. *Plant Cell* **17**: 525-536

**Xue T, Wang D, Zhang S, Ehltng J, Ni F, Jakab S, Zheng C, Zhong Y** (2008) Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and Arabidopsis. *BMC Genomics* **9**: 550

**Yao HY, Xue HW** (2011) Signals and mechanisms affecting vesicular trafficking during root growth. *Curr Opin Plant Biol* **14**: 571-579

**Yi K, Menand B, Bell E, Dolan L** (2010) A basic helix-loop-helix transcription factor controls cell growth and size in root hairs. *Nat Genet* **42**: 264-267

**Yorimitsu T, Sato K, Takeuchi M** (2014) Molecular mechanisms of Sar/Arf GTPases in vesicular trafficking in yeast and plants. *Front Plant Sci* **5**: 411

**Yuan JC, Song JH, Ma HL, Song XQ, Wei HP, Liu YH** (2013) Ectopic expression a maize ADP-ribosylation factor gene in Arabidopsis, increase plant size and growth rate. *J Plant Biochem Biotechnol* **24**: 161–166

**Zeba N, Isbat M, Kwon NJ, Lee MO, Kim SR, Hong CB** (2009) Heat-inducible C3HC4 type RING zinc finger protein gene from *Capsicum annuum* enhances growth of transgenic tobacco. *Planta* **229**: 861–871

**Zhang H, Han B, Wang T, Chen S, Li H, Zhang Y, Dai S** (2012) Mechanisms of plant salt response: insights from proteomics. *J Proteome Res* **11**: 49–67

**Zhang H, Sonnewald U** (2017) Differences and commonalities of plant responses to single and combined stresses. *Plant J* doi: 10.1111/tpj.13557

**Zhang X, Gou M, Liu CJ** (2013) *Arabidopsis* Kelch repeat F-box proteins regulate phenylpropanoid biosynthesis via controlling the turnover of phenylalanine ammonia-lyase. *Plant Cell* **25**: 4994-5010

**Zhu JK** (2001) Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci* **6**: 66–71

# ABSTRACT

## Functional Characterization of Plant ADP-ribosylation Factor 1 Gene

Dong Kyun Kim

Department of Biological Sciences

The Graduate School

Seoul National University

Abiotic stresses such as high temperature, drought, cold, and high salinity adversely affects plant growth and development and significantly reduce the productivity of cultivated crops. Damage caused by abiotic stresses further expected to increase by global climatic changes. Therefore, studying the gene-level response of plants to abiotic stresses is critical to develop the abiotic stresses tolerant crops. *CaPP2C* (*Capsicum annum* protein phosphatase 2C), *CaMAPK1* (*Capsicum annum* mitogen-activated protein kinase 1), and *CaBI-1* (*Capsicum annum* Bax inhibitor-1) cDNA clones were isolated from the cDNA library of heat-stressed hot peppers (*Capsicum annum*). The transcriptions of these genes were induced by diverse abiotic stresses. *CaPP2C*, *CaMAPK1*, and *CaBI-1* were

mobilized and over-expressed into tobacco (*Nicotiana tabacum*) using *Agrobacterium* mediated transformation under the control of CaMV 35S promoter. Transgenecity confirmed by the RNA blot analysis and detected transcript of *CaPP2C*, *CaMAPK1*, and *CaBI-1* in over-expressed transgenic tobacco plants in normal growth conditions. To elucidate the functions of these genes in abiotic stresses tolerance, bioassay was performed with these transgenic tobacco plants. These transgenic tobacco plants did not show any abiotic tolerance. The transcriptome analysis revealed that the ARF gene was highly up-regulated in these transgenic tobacco plants. Assuming the ARF gene may have the function in abiotic stress tolerance. Nine ARF genes were isolated from the tobacco. Among the isolated ARF cDNA clone, the *NtARF1* (*Nicotiana tabacum* ADP-ribosylation factor 1) gene was highly expressed in the *CaPP2C* transgenic tobacco plant. The expression of the *NtARF1* transcript was also induced by high-temperature stress. To elucidate the *in vivo* function of *NtARF1*, *NtARF1* ORF was over-expressed into tobacco. *NtARF1* transgenic tobacco plants exhibited enhanced growth including, plant height, number of flowers per plant, and early seed germination compared with vector control plants. *NtARF1* transgenic tobacco transgenic plants also showed tolerance to abiotic stresses, such as high-temperature, drought, cold, and high salinity. I also classified ARF family genes in plant species through systematic genomic DNA sequence data-mining, focusing on the fully sequenced and

extensively annotated genomes of wild type plants and some of the major crops. The phylogenetic analysis revealed that one group (Class 1), comprised the highest number of ARFs among the four groups obtained for all plant species analyzed, especially for crop plant species. Thus, Class 1 ARFs of crop species were highly enriched as compared to the wild type species.

**Keywords:** ADP-ribosylation factor, abiotic stress, *Nicotiana tabacum*, transgenic plant, abiotic stress tolerant plant, seed germination, phylogenetic tree

***Student Number:*** 2010-20305